

NILTON CÉSAR MANTOVANI

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA E CULTIVO *in vitro* DE
Bixa orellana L. E *Ginkgo biloba* L.**

**Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para obtenção do título
de *Doctor Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M293p
2007

Mantovani, Nilton César, 1966-

Propagação vegetativa e cultivo *in vitro* de *Bixa orellana*
L. e *Ginkgo biloba* L. / Nilton César Mantovani.

– Viçosa, MG, 2007.

xii, 135f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura.
2. *Bixa orellana* - Propagação in vitro. 3. *Ginkgo biloba* -
Propagação in vitro. 4. Morfogênese. 5. Metabólitos
secundários. 6. Histologia. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.62

NILTON CÉSAR MANTOVANI

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA E CULTIVO *in vitro* DE
Bixa orellana L. E *Ginkgo biloba* L.**

**Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para obtenção do título
de *Doctor Scientiae*.**

APROVADA: 6 de setembro de 2007

**Prof^a. Magali Ferrari Grando
(Co-orientadora)**

Prof^a. Eunice Oliveira Calvete

Prof. Alexandre Augusto Nienow

Prof^a. Cerci Maria Carneiro

**Prof. Wagner Campos Otoni
(Orientador)**

À minha querida
família

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal, por possibilitar este curso.

À Universidade de Passo Fundo e ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, por possibilitar a realização da segunda fase do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Wagner Campos Otoni e à Professora Magali Ferrari Grandó, pela orientação, amizade, compreensão e confiança.

Aos co-orientadores, pelo auxílio.

Aos colegas de aula e de laboratório, pelo companheirismo.

BIOGRAFIA

NILTON CÉSAR MANTOVANI, filho de Euclides Vicenço Mantovani e Maria Viccari Mantovani, nasceu no dia 21 de maio de 1966, na cidade de Passo Fundo, RS.

Graduado em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no Rio Grande do Sul, em 1993. Em 1997 defendeu dissertação de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da UFSM.

Em 2003 iniciou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), o Programa de Pós-Graduação em Botânica, em nível de doutorado, defendendo tese em 2007.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE FRUTOS, AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE E SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Bixa orellana* L.

RESUMO	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Material vegetal	13
2.2 Caracterização morfológica dos frutos e avaliação da produção de sementes	13
2.3 Extração e determinação do teor de bixina em sementes	13
2.4 Análises estatísticas	14
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1 Caracterização morfológica dos frutos e produção de sementes	15
3.2 Teor de bixina em sementes	18
4 CONCLUSÕES	21
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

CAPÍTULO II

RESGATE VEGETATIVO E PRODUÇÃO DE EXPLANTES DE *Bixa orellana* L. PARA PROCESSOS DE PROPAGAÇÃO CLONAL

RESUMO	24
1 INTRODUÇÃO	25
2 MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 Material vegetal	27
2.2 Estaquia convencional	27
2.3 Indução de brotações e enraizamento de estacas em sistema hidropônico	28
2.4 Alporquia	29

2.5 Análises estatísticas	29
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1 Estaquia convencional	30
3.2 Indução de brotações e enraizamento de estacas em sistema hidropônico	32
3.3 Alporquia	33
4 CONCLUSÕES	37
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

CAPÍTULO III

CULTIVO *in vitro* DE *Bixa orellana* L. A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE PLANTAS ADULTAS

RESUMO	41
1 INTRODUÇÃO	42
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 Material vegetal	44
2.2 Desinfestação e estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos nodais	44
2.3 Meio de cultura e condições ambientais utilizadas durante o cultivo <i>in vitro</i>	46
2.4 Análises estatísticas	46
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4 CONCLUSÕES	54
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

CAPÍTULO IV

REGENERAÇÃO *in vitro* EM EXPLANTES JUVENIS DE *Bixa orellana* L.

RESUMO	58
1 INTRODUÇÃO	59
2 MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1 Material vegetal	61
2.2 Germinação de sementes <i>in vitro</i> e obtenção de explantes	61
2.3 Potencial morfogênico de cotilédones, hipocótilos e raízes	61
2.4 Potencial morfogênico de explantes ao longo do eixo hipocotiledonar e radicular	62
2.5 Efeito de diferentes citocininas na indução de brotos adventícios em explantes hipocotiledonares	62

2.6 Enraizamento de brotos adventícios	63
2.7 Meios de cultura e condições ambientais utilizadas durante o cultivo <i>in vitro</i>	63
2.8 Avaliações histológicas	64
2.9 Análises estatísticas	64
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1 Potencial morfogênico de cotilédones, hipocótilos e raízes	65
3.2 Potencial morfogênico de explantes ao longo do eixo hipocotiledonar e radicular	69
3.3 Efeito de diferentes citocininas na indução de brotos adventícios em explantes hipocotiledonares	71
3.4 Enraizamento de brotos adventícios	73
3.5 Evidências morfológicas e histológicas da organogênese e regeneração de plantas	75
4 CONCLUSÕES	81
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

CAPÍTULO V

CALOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES DE PLANTAS ADULTAS DE <i>Ginkgo biloba</i> L. E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	
RESUMO	85
1 INTRODUÇÃO	86
2 MATERIAL E MÉTODOS	88
2.1 Material vegetal e obtenção de explantes	88
2.2 Efeitos do balanço auxina/citocinina na indução de calos em discos foliares	89
2.3 Influência do tipo de explante foliar na indução de calos	89
2.4 Efeitos do tipo de auxina e de citocinina na indução de calos em discos foliares	89
2.5 Efeitos de diferentes carboidratos no desenvolvimento de calos	90
2.6 Efeito do regime luminoso no desenvolvimento de calos	90
2.7 Meio de cultura e condições ambientais utilizadas durante o cultivo <i>in vitro</i>	91
2.8 Análise morfológica dos calos	91
2.9 Avaliações histológicas.....	91
2.10 Avaliação da produção de metabólitos secundários em calos e folhas	92
2.11 Análises estatísticas	93
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	94

3.1 Efeitos do balanço auxina/citocinina na indução de calos em discos foliares	94
3.2. Influência do tipo de explante foliar na indução de calos	97
3.3 Efeitos do tipo de auxina e de citocinina na indução de calos em discos foliares	98
3.4 Efeitos de diferentes carboidratos no desenvolvimento de calos	100
3.5 Efeito do regime luminoso no desenvolvimento de calos	101
3.6 Análise morfológica e histológica dos calos produzidos a partir de explantes foliares	102
3.7 Avaliação da produção de metabólitos secundários em calos e folhas	104
4 CONCLUSÕES	111
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

CAPÍTULO VI

INDUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE BROTONS AXILARES EM EXPLANTES NODAIS DE PLANTAS ADULTAS DE *Ginkgo biloba* L.

RESUMO	115
1 INTRODUÇÃO	116
2 MATERIAL E MÉTODOS	118
2.1 Material vegetal, obtenção e desinfestação dos explantes	118
2.2 Indução de crescimento de gemas axilares e multiplicação de brotos	119
2.3 Meio de cultura e condições ambientais utilizadas durante o cultivo <i>in vitro</i>	119
2.4 Análises estatísticas	120
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	121
3.1 Isolamento de segmentos nodais e indução de crescimento de gemas axilares	121
3.2 Multiplicação de brotos	123
3.3 Padrões de desenvolvimento de gemas caulinares <i>in vitro</i> versus <i>in vivo</i>	126
4 CONCLUSÕES	131
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS	135

RESUMO

MANTOVANI, Nilton César, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2007. **Propagação vegetativa e cultivo *in vitro* de *Bixa orellana* L. e *Ginkgo biloba* L.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Co-Orientadores: Magali Ferrari Grando, Aloísio Xavier e Sérgio Yoshimitsu Motoike.

Bixa orellana L. e *Ginkgo biloba* L. são espécies lenhosas que sintetizam compostos medicinais exclusivos e de relevante importância econômica. Esta pesquisa teve como objetivos: (1) avaliar e selecionar genótipos de *B. orellana* com altos teores de bixina nas sementes; (2) resgatar vegetativamente genótipos de *B. orellana*, visando à produção de explantes para o cultivo *in vitro*; (3) estabelecer um sistema de propagação *in vitro* de *B. orellana*, a partir de brotos axilares em segmentos nodais de plantas adultas, e de brotos adventícios em explantes juvenis; (4) induzir a formação de calos em explantes foliares de *G. biloba* e avaliar a produção de metabólitos secundários *in vitro* e, (5) estabelecer um sistema de propagação *in vitro* de *G. biloba*, a partir de brotos axilares em segmentos nodais de plantas adultas. Genótipos de *B. orellana*, com alto teor de bixina, foram resgatados por alporquia e propagados *in vitro* a partir da indução de brotos axilares em segmentos nodais. Os explantes foram desinfestados com soluções de hipoclorito de sódio (10 minutos a 1,25%) e PPMTM (20 minutos a 20%), e cultivados em meio MS. Nestas condições foram eliminados os contaminantes fúngicos, porém, em concentrações mais altas, as soluções desinfestantes provocaram necrose e morte dos explantes. A adição de PPMTM 1%, Timentin[®] 600 mg.L⁻¹ e Agrimicina[®] 300 mg.L⁻¹ ao meio de cultura, controlou parcialmente o desenvolvimento de bactérias nos explantes. O desenvolvimento de brotos axilares ocorreu em 28% dos segmentos nodais. Brotos adventícios foram induzidos em discos cotiledonares, segmentos hipocotiledonares e radiculares, cultivados nos meios MS e WPM, com 4,56 µM de ZEA. Identificou-se um gradiente de potencial morfogênico, que cresce do ápice em direção à base, em hipocótilos e raízes. Altas frequências de regeneração de brotos foram induzidas em segmentos hipocotiledonares, cultivados em meio WPM, com

4,56 μM de TDZ (85%) e com 4,56 μM de ZEA (80%). O AIB a 4,9 μM induziu maior frequência de brotos enraizados (25%) e número de raízes (2). Plantas completas produzidas *in vitro* foram transferidas para substrato e aclimatizadas com sucesso em casa de vegetação. As análises histológicas comprovaram a origem adventícia dos brotos, a partir da organização de centros meristemáticos em células corticais de segmentos de hipocótilo, caracterizando a organogênese direta em *B. orellana*. Em *G. biloba*, a calogênese em explantes foliares, é dependente de uma fonte exógena de auxina. Altas frequências calogênicas foram induzidas em discos foliares, cultivados no meio MS, com ANA 4,4 μM combinada com BAP a 0,4 μM (100%) ou 4,4 μM (92%). A máxima produção de massa fresca de calos foi obtida com o carboidrato sacarose (394,57 mg) e o subcultivo na ausência de luz (678,3 mg). O BAP alterou o padrão dos calos primários, branco amarelados e friáveis, para verdes e compactos, quando utilizado por três subcultivos. As lactonas terpênicas ginkgolídeos A e B, e os glicosídeos flavonóides quercetina, camferol e rutina, não foram detectados nos calos ou folhas de *G. biloba*, através dos métodos de TLC e HPLC. A propagação *in vitro* de *G. biloba* foi obtida a partir da indução e multiplicação de brotos axilares em segmentos nodais, excisados de ramos herbáceos de plantas matrizes adultas cultivadas em casa de vegetação. A caseína hidrolisada (500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), no meio MS, foi essencial para a indução de altas taxas de emissão de brotos axilares nos segmentos nodais (85%), de multiplicação (66,6%), e de formação de múltiplos brotos nos explantes. A cinetina e o carvão ativado apresentaram efeitos inibitórios neste processo.

ABSTRACT

MANTOVANI, Nilton César, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, August 2007. **Vegetative propagation and *in vitro* culture of *Bixa orellana* L. and *Ginkgo biloba* L.** Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-Advisers: Magali Ferrari Grando, Aloísio Xavier and Sérgio Yoshimitsu Motoike.

Bixa Orellana L. and *Ginkgo biloba* L. are woody species that synthesize exclusive medicinal components of economic importance. The objectives of this study were: (1) to evaluate and select genotypes of *B. orellana* with high bixin content; (2) to rescue vegetative genotypes of *B. orellana* aiming the production of explants for the *in vitro* culture; (3) to establish a system of *in vitro* propagation of *B. orellana* from axillaries shoots in nodal segments of adult plants, and adventitious shoots from juvenile explants; (4) to induce the formation of calli from leaf explants of *G. biloba* and to evaluate the *in vitro* production of secondary metabolites; (5) to establish a system of *in vitro* propagation of *G. biloba* from axillaries shoots in nodal segments of adult plants. Genotypes of *B. orellana* with high bixin content had been rescued by air layering technique and propagated *in vitro* by the induction and growth of axillaries shoots from nodal segments. The explants were disinfested with of sodium hipochloride solution (10 minutes 1.25%) and PPMTM (20 minutes 20%), and cultivated on MS medium culture. The addition of PPMTM 1%, Timentin[®] 600 mg.L⁻¹ and 300 Agrimicin[®] mg.L⁻¹ to the culture medium partially controlled the development of bacteria on the explants. The development of axillaries shoots was observed in 28% of the nodal segments. Adventitious shoots were induced in cotyledon discs, hypocotyl and root segments cultivated on MS and WPM media with ZEA 4.56 µM. It was identified a gradient of morphogenic potential that increase from the apex in direction to the base of the hypocotyls and roots explants. High frequencies of regeneration of shoots were induced in cultivated hypocotyl segments on WPM medium culture with 4.56 µM TDZ (85%) and with 4.56 µM ZEA (80%). The AIB 4.9 µM induced greater frequency of

rooted shoots (25%) and roots number (2). Complete plants *in vitro* produced were transferred to substrate and successfully acclimatized in a greenhouse. The histological analysis had proven the adventitious origin of the shoots from the organization of meristematic centers in cortical cells of hypocotyl segments, characterizing direct organogenesis in *B. orellana*. In *G. biloba* leaf explants callus formation is dependent of an exogenous source of auxin. Greater callus frequencies had been induced from leaf discs cultivated on MS medium with ANA 4.4 μM combined with 0.4 BAP μM (100%) or 4.4 μM (92%). The maximum production of callus fresh mass was observed with carbohydrate sucrose (394,57 mg) and the subcultivation in the dark (678,3 mg). The BAP modified the pattern of the primary callus from white yellowish friable to green compact one when used by three subcultivation period. The terpenes trilactones ginkgolides A and B, and the flavonol glycosides quercetin, kaempferol and rutin have not been observed in calli cultivated *in vitro* and in leaves of *G. biloba* through TLC and HPLC methods. The *in vitro* propagation of *G. biloba* was carried out by means of axillary shooting in nodal segments excised from herbaceous branches, harvested from adult plants maintained in greenhouse. The hydrolyzed casein (500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) in MS medium, was essential for the induction of higher frequencies of axillary shoots in nodal segments (85%), for multiplication of these shoots (66.6%), and also for formation of multiple shoots in the explants. The kinetin and the activated charcoal were inhibitory to this process.

INTRODUÇÃO GERAL

O uso das plantas na alimentação humana e no tratamento de doenças é uma prática milenar. A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2003) estima que metade dos medicamentos mais vendidos no mundo tem sua origem em produtos naturais de plantas, e recomenda o desenvolvimento de pesquisas visando o uso da flora com propósitos terapêuticos.

Um grande número de compostos químicos, produzidos pelas plantas, é utilizado pelas indústrias de alimentos, de cosméticos e, principalmente, de medicamentos. Estima-se que aproximadamente 15 a 25% do genoma vegetal específica rotas de biossíntese destes compostos (PICHESKY e GANG, 2000).

Destacam-se, dentre as inúmeras plantas arbóreas que sintetizam metabólitos de interesse, o urucum (*Bixa orellana* L.) e o ginkgo (*Ginkgo biloba* L.).

O urucum, uma planta arbórea da família Bixaceae, originária da América Tropical e nativa das florestas Amazônica e Atlântica (JOLY, 2002), apresenta a rota biossintética dos pigmentos carotenóides bixina e norbixina (MERCADANTE e PFANDER, 1998; JAKO et al. 2002; KIOKIAS e GORDON, 2003), sintetizados na testa das sementes e depositados na sua superfície externa (JAKO et al., 2002), conferindo a estas a coloração típica avermelhada. Estes carotenóides são sintetizados exclusivamente pelo urucum.

Os benefícios destes compostos à saúde humana são atribuídos às propriedades dos carotenóides, relacionadas com a sua conversão em vitamina A, atividades antioxidantes (KIOKIAS e GORDON, 2003; AGNER et al., 2004) e antimicrobianas (FLEISCHER et al., 2003). Os pigmentos de urucum têm sido utilizados desde a antiguidade em rituais indígenas, na pintura e proteção da pele, na culinária de diferentes regiões brasileiras, na medicina tradicional, e mais intensamente na atualidade pelas indústrias, como corantes aditivos em alimentos, cosméticos, fármacos e tintas (LAURO, 1991; NAZARÉ et al. 1996; BOUVIER et al., 2003).

A bixina é um dos corantes aditivos naturais mais utilizados pela indústria, desde que os corantes sintéticos passaram a ser substituídos pelos naturais (LAURO, 1991).

Tradicionalmente, os produtores de sementes de urucum utilizam plantas propagadas por sementes, para o estabelecimento dos plantios (SÃO JOSÉ et al., 1999). Em função de ser uma espécie de polinização predominantemente cruzada, a propagação de *B. orellana* através de sementes resulta em alto grau de variabilidade genética nas progênes, acarretando desuniformidade das plantas, cor, forma e tamanho dos frutos, produtividade de sementes, tolerância a pragas e doenças e, principalmente, no teor de bixina (REBOUÇAS e SÃO JOSÉ, 1996). Eira e Melo (1997) destacam ainda, como desvantagens para a propagação sexuada de *B. orellana*, o curto período de viabilidade e a baixa taxa de germinação das sementes.

Técnicas de propagação vegetativa, como o enraizamento de estacas, a enxertia e, a alporquia, empregadas com a finalidade de reduzir a heterogeneidade entre plantas *B. orellana*, apresentam custos elevados pela baixa eficiência, quando utilizadas em urucum (SÃO JOSÉ et al., 1999).

A cultura de tecidos, mediante a indução de diferentes vias de expressão morfogênica, tem possibilitado a propagação *in vitro* de *B. orellana* (VIEIRA et al., 2000; D'SOUZA e SHARON, 2001; SHA VALLI KHAN et al., 2002; PAIVA NETO et al., 2003 a, b, c; CARVALHO et al., 2005), e estudos visando à transformação genética desta espécie (PAIVA NETO et al., 2003 c; ZALDÍVAR-CRUZ et al., 2003). Estes trabalhos utilizam como explantes tecidos embrionários ou derivados de plântulas obtidas a partir da germinação de sementes *in vitro*, o que não assegura a identidade genética do material selecionado como fonte de sementes, uma vez que da propagação sexuada resultam variações muitas vezes indesejáveis do ponto de vista produtivo. Por outro lado, a utilização de explantes de genótipos selecionados, que já expressam características superiores, possibilitaria, através das técnicas de cultura de tecidos, a manutenção da identidade genética do material propagado, representando ainda um ganho considerável no processo produtivo.

O *Ginkgo biloba* L., uma gimnosperma da família Ginkgoaceae, originária do Leste da Ásia (GIFFORD e FOSTER, 1989; BRENNER et al., 2005), assim como o urucum, sintetiza compostos de importância medicinal. Como planta ornamental, o ginkgo é cultivado em parques, praças e passeios de cidades, em diferentes países do mundo (GIFFORD e FOSTER, 1989).

Os principais compostos sintetizados pelo ginkgo, com propriedades terapêuticas mais importantes, são os glicosídeos flavonóides (quercetina, camferol e iso-ramnetina) e as lactonas terpênicas, unicamente encontradas nesta espécie (os ginkgolídeos, e o bilobalídeo), acumuladas nas folhas, na casca e nas raízes (VAN BEEK, 2002), também detectados em plantas regeneradas *in vitro* e em culturas celulares (CARRIER et al., 1991; CAMPER et al., 1997; BALZ et al., 1999; YU et al., 1999, 2004; KANG et al., 2006; GRAY et al., 2006; SOHIER e COURTOIS, 2007). Estes metabólitos são amplamente utilizados na medicina, em função das propriedades terapêuticas relacionadas à regulação da circulação sanguínea e proteção contra radicais livres (CURTIS-PRIOR et al., 1999 BIRKS et al., 2002).

As indústrias farmacêuticas exploram o potencial medicinal dos compostos de ginkgo através da produção de extratos padronizados de partes vegetativas das plantas (GRAY et al., 2006). A matéria-prima para a produção destes extratos é totalmente importada pela indústria brasileira, especialmente de países como a França e os Estados Unidos, que cultivam esta planta em extensos plantios (CAMPER et al., 1997; SOHIER e COURTOIS, 2007).

A propagação do ginkgo, a partir de sementes, encontra dificuldades devido à dioicia da espécie, a longa fase juvenil (MONTEZ-LOPEZ e RODRIGUEZ, 2001), e a baixa germinabilidade e viabilidade das sementes (TOMMASI e SCARAMUZZI, 2004). A propagação vegetativa, através da estaquia, apresenta baixo rendimento, sendo extremamente dependente da natureza juvenil dos explantes (MONTEZ-LOPEZ e RODRIGUEZ, 2001; SEXTO, 2005).

A propagação *in vitro* do ginkgo, a partir de diferentes rotas morfogênicas, foi relatada exclusivamente a partir de explantes de embriões zigóticos, ou de plântulas obtidas da germinação de sementes *in vitro*

(LAURAIN et al., 1996; HAO et al., 2000; MONTES-LÓPEZ e RODRÍGUEZ, 2001; HU et al., 2002; TOMMAZI e SCARAMUZZI, 2004, CHOI et al., 2003/4). O cultivo de explantes de plantas adultas, como os segmentos nodais e ápices caulinares, até o momento, não tem proporcionado sucesso na regeneração de plantas completas de ginkgo (MONTES-LÓPEZ e RODRÍGUEZ, 2001; TOMMAZI e SCARAMUZZI, 2004).

A demanda comercial por compostos economicamente importantes tem sido atendida principalmente pela síntese química e, em menor extensão, pela sua extração de fontes naturais. Na maioria dos casos, como o do pigmento natural bixina, e dos ginkgolídeos e bilobalídeo, a oferta se restringe a somente duas plantas terrestres, a *Bixa orellana* L. e o *Ginkgo biloba* L. Existe interesse crescente na manipulação em plantas da composição e do conteúdo de diferentes compostos. Esta manipulação, via engenharia genética, envolvendo a transformação de células, depende das técnicas de cultura de células, tecidos e órgãos *in vitro*, para a posterior regeneração de plantas (FERREIRA et al., 1998).

A cultura *in vitro* de células, tecidos e órgãos, permite a reprodução de espécies vegetais que apresentam limitação na forma sexuada de reprodução, ou ainda, para aquelas que, através das técnicas convencionais de propagação vegetativa, são difíceis de reproduzir (DEBERGH e READ, 1991). As técnicas de cultura de tecidos podem ser aplicadas em diferentes etapas de um programa de melhoramento genético e, em certos casos, apresentar soluções únicas para a propagação de determinados genótipos (FERREIRA et al., 1998).

Com base na importância das espécies *Bixa orellana* L. e *Ginkgo biloba* L., visto que ambas sintetizam compostos medicinais exclusivos de interesse econômico, e na problemática que apresentam quanto às formas de propagação sexuada e assexuada, especialmente *in vitro*, a partir de explantes adultos, busca-se através deste estudo: (1) avaliar e selecionar genótipos de *B. orellana* com altos teores de bixina nas sementes; (2) resgatar vegetativamente genótipos de *B. orellana*, visando à produção de explantes para o cultivo *in vitro*; (3) estabelecer um sistema de propagação *in vitro* de *B. orellana*, a partir de brotos axilares em segmentos nodais de plantas adultas e, de brotos adventícios em explantes juvenis; (4) induzir a

formação de calos em explantes foliares de *G. biloba* e avaliar a produção de metabólitos secundários *in vitro* e, (5) estabelecer um sistema de propagação *in vitro* de *G. biloba*, a partir de brotos axilares em segmentos nodais de plantas adultas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNER, A.R.; BARBISAN, L.F.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D.M.F. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p.1687-1693, 2004.
- BALZ, J.P.; COURTOIS, D.; DRIEU, J.; DRIEU, K.; REYNOIRD, J.P.; SOHIER, C.; TENG, B.P.; TOUCHÉ, A.; PÉTIARD, V. Production of Ginkgolides and Bilobalide by *Ginkgo biloba* plants and tissue cultures. **Planta Medica**, v. 65, n. 7, p. 620-626. 1999.
- BIRKS, J.; GRIMLEY, E.J.; VAN DONGEN, M. *Ginkgo biloba* for cognitive impairment and dementia. Oxford: Update Software v. 4, 2002, Aug. 30: 1-53. Available from www.updateusa.com/abs/titlelist.htm
- BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CÂMARA, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, v. 300, p. 2089-2091, 2003.
- BRENNER, E.D.; KATARI, M.S.; STEVENSON, D.W.; RUDD, S.S.; DOUGLAS, A.W.; MOSS, W.N.; TWIGG, R.W.; RUNKO, S.; STELLARI, G.M.; McCOMBIE, W.R.; CORUZZI, G.M. EST analysis in *Ginkgo biloba*: an assessment of conserved developmental regulators and gymnosperm specific genes. **BMC Genomics**, v. 6, n. 143, 2005. [<http://biomedcentral.com/1471-2164/6/143>].
- CAMPER, N.D.; COKER, P.S.; WEDGE, D. E.; KEESE, R. J. *In vitro* culture of *Ginkgo*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 33, p. 125-127, 1997.
- CARVALHO, J.F.R.P de.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, n. 1, p. 69-75, 2005.
- CARRIER, D.J.; CHAURET, N.; MANCINI, M.; COULOMBE, P.; NEUFELD, R.; WEBWER, M.; ARCHAMBAULT, J. Detection of ginkgolide A in *G. biloba* cell cultures. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 256-259, 1991.
- CHOI, P. S.; CHO, D. Y.; SOH, W. Y. Shoot organogenesis from immature zygotic embryo cultures of *Ginkgo biloba*. **Biologia Plantarum**, v. 47, n. 2, p. 309-319, 2003/4.
- CURTIS-PRIOR, P.; VERE, D.; FRAY, P. Therapeutic value of *Ginkgo biloba* in reducing symptoms of decline in mental function. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v.51, p. 535-541, 1999.
- DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C., ZIMMERMAN, R.H. (Eds.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 1-13.
- D'SOUZA, M.C.; SHARON, M. *In vitro* clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 37, p. 168-172, 2001.
- EIRA, M.T.S., MELO, C.M.C. *Bixa orellana* L. Seed germination and conservation. **Seed Science and Technology**, v. 25, p. 373-380, 1997.

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. IN: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Embrapa-SPI, Brasília, Embrapa/CNPH, 1998. p. 21-43.

FLEISCHER, T.C.; AMEADE, E.P.K.; MENSAH, M.L.K.; SAWER, I.K. Antimicrobial activity of leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 136-138, 2003.

GIFFORD, E.M.; FOSTER, A.S. **Morphology and evolution of vascular plants**. New York: W.H. Freeman and Company, 1989.

GRAY, D. E.; UPTON, R.; CHANDRA, A.; PORTER, A.; HARRIS, R. K. Quantitative analysis of flavonol glycosides in *Ginkgo biloba*: a comparison of two analytical methods. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p. 56-62, 2006.

HAO, G. P.; DU, X. H.; YOU, Y.; HOV, F. L.; FAN, Z. G.; ZHANG, H. J. Effects of various factors on the growth and development of cultured axillary buds of *Ginkgo biloba in vitro*. **Forest Research**, v. 13, n. 2, p. 217-221, 2000.

HU, H.; YANG, J.; YANG, D.; WANG, Y. Study on stem section culture conditions *in vitro* in *Ginkgo biloba*. **Scientia Silvae Sinicae**, v. 38, n.3, p.52-56, 2002.

JAKO, C.; COUTU, C.; ROEWER, I.; REED, D.W.; PELCHER, L.E.; COVELLO, P.S. Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis. **Plant Science**, v. 163, p. 141-145, 2002.

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

KANG, S. M.; MIN, J.Y.; KIM, Y. D.; KANG, Y. M.; PARK, D. J.; JUNG, H. N.; KIM, S. W.; CHOI, M. S. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of bilobalide and ginkgolides in cell cultures of *Ginkgo biloba*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 42, p. 44-49, 2006.

KIOKIAS, S.; GORDON, M.H. Antioxidant properties of annatto carotenoids. **Food Chemistry**, v. 83, p. 523-529, 2003.

LAURO, G.J. A primer on natural colors. **Cereal Foods World**, v. 36, n. 11, p. 949-953, 1991.

LAURAIN, D.; CHÉNIEUX, J. C.; TRÉMOUILLAUX-GUILLER, J. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Ginkgo biloba*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 19-24, 1996.

MERCADANTE, A.Z.; PFANDER, H. Carotenoids from annatto: a review. **Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, p. 79-91, 1998.

MONTEZ-LOPEZ, J. J.; RODRIGUEZ, J. L. de La O. *In vitro* establishment and sprouting of axillary buds and shoot apex of ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). **Revista Chapingo Serie Horticultura**, v. 7, n. 1, p. 49-59, 2001.

NAZARÉ, R.F.R. de; ALVES, S. de M.; BARBOSA, W.C.; RODRIGUES, I. A.; FARIA, L.J.G.; KUKUHARA, K. Estudo para identificação de vegetais produtores de corantes ocorrentes na flora amazônica. EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (Belém-PA). **Geração de tecnologia para o desenvolvimento do Trópico Úmido**. Belém: EMBRAPA-CPATU/JICA. 1996.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL de SAÚDE. **Dados do consumo de fitoterápicos no mundo**. Acesso em em 24 de maio de 2003. Online. Disponível no site: www.uol.com.br/noticia/2003/março/51/501/htm.

PAIVA NETO, V.B.; BOTELHO, M.N.; AGUIAR, R.M.; SILVA, E.A.M.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.39, n. 6, p. 629-634, 2003a.

PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.,R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, n. 4, p. 32-38, 2003b.

PAIVA NETO, V.B.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Mannose - a potential selection system for genetic transformation of annatto (*Bixa orellana* L.). **Biologia Plantarum**, v. 47, n. 3, p. 441-444, 2003c.

PICHERSKY, E.; GANG, D.R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 10, p. 439-445, 2000.

REBOUÇAS, T.N.H.; SÃO JOSÉ, A.R. **A cultura do urucum: práticas de cultivo e comercialização**. Vitória da Conquista- BA: DFZ/UESB/SBCN, 1996. 42p.

SHA VALLI KHAN, P.S.; PRAKASH, E.; RAO, K.R. Callus induction and plantlet regeneration in *Bixa orellana* L., an annatto-yielding tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 38, p. 186-190, 2002.

SÃO JOSÉ, A.R.; MASCARENHAS, J.M.O.; STRINGHETA, P.C.; REBOUÇAS, T.N.H.; OLIVEIRA, V.P. de. Cultivo del achiote (*Bixa orellana* L.) en Brasil. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 3, p. 113-119, 1999.

SEXTO, P. A. da S. **Cultivo in vitro e estaquia de *Ginkgo biloba* L.** 2005. 179 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2005.

SOHIER, C.; COURTOIS, D. *Ginkgo biloba* and production of secondary metabolites. In: KAYSER, O.; QUAX, W.J. (Eds.). **Medicinal plant biotechnology: from basic research to industrial applications**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim. p. 493-514, 2007.

TOMMASI, F.; SCARAMUZZI, F. *In vitro* propagation of *Ginkgo biloba* by using various bud cultures. **Biologia Plantarum**, v. 48, n. 2, p. 297-300, 2004.

VAN BEEK, T. A. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. **Journal of Chromatography**, v. 937, p. 21-55, 2002.

VIEIRA, I.M.S.; BARBOSA, A.S.A.; SERRA, A.G.P.; SILVA, S.P.G.; MOTA, M.G.C.; BOTELHO, M.N. Embriogênese somática de urucu (*Bixa orellana* L.), cultivar EMBRAPA-37. In: Congresso Brasileiro de Botânica, 51, 200, Brasília. **Proceedings ...** Brasília, 2000. p.23

YU, R.; ZHAO, H.; ZHENG, Y.; YAO, X.; ZHANG, H. Studies on the callus cultures of *Ginkgo biloba* and its metabolites-Ginkgolides. **Chinese Journal of Biotechnology**, v.15, n.1, p.51-58, 1999.

YU, R. M.; GAO, Y.; SONG, L. Y.; ZHANG, D. Z.; YE, W. C.; YAO, X.S. The immobilized cells cultures of *Ginkgo biloba* and the production of ginkgolides. **Acta Botanica Yunnanica**, v. 26, n. 3, p. 338-344, 2004.

ZALDÍVAR-CRUZ, J.M.; BALLINA-GÓMEZ, H.; GUERRERO-RODRÍGUEZ, C.; AVILÉS-BERZUNZA, E.; GODOY-HERNANDÉZ, G.C. *Agrobacterium*-mediated transient transformation of annatto (*Bixa orellana*) hypocotyls with the gus reporter gene. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 281-284, 2003.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE FRUTOS, AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE E SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Bixa orellana* L.

RESUMO

A caracterização morfológica de frutos, a avaliação da produtividade de sementes e do teor de bixina presente nas sementes de 10 genótipos de urucum (*Bixa orellana* L.), foram realizadas a fim de fornecer subsídios para a seleção de genótipos superiores para estas características. Houve variação em todas as características avaliadas entre os 10 genótipos. Os frutos de todos os genótipos são recobertos por cerdas ou pêlos, apresentam coloração avermelhada, verde, amarela ou vermelha, e duas formas básicas, oval ou lanceolada. Os frutos apresentaram comprimentos médios que variaram entre 3,1 cm a 4,8 cm, e larguras entre 2,4 cm a 3,1 cm. O número médio de sementes por fruto variou de 41,5 (genótipo 1) a 50,6 (genótipo 7). O peso mínimo de 100 sementes foi de 1,1g (genótipo 4) e máximo de 2,24 g (genótipo 2). Os teores de bixina presentes nas sementes variaram de 3,7% (genótipo 10) a 5,05% (genótipo 6). O teor de bixina decresceu com o aumento no período de armazenamento das sementes.

Palavras-chave: *Bixa orellana*, bixina, frutos, sementes.

1 INTRODUÇÃO

Bixa orellana L. é uma planta lenhosa da família Bixaceae, originária da América Tropical (JOLY, 2002), nativa das florestas Amazônica e Atlântica, conhecida no Brasil como urucum, urucu, açafroa, entre outros (MARCHIORI, 2000). As sementes são revestidas externamente por pigmentos avermelhados, constituídos principalmente pelos carotenóides bixina e norbixina (MERCADANTE e PFANDER, 1998; JAKO et al., 2002; KIOKIAS e GORDON, 2003), amplamente empregados pelas indústrias alimentícias, farmacêuticas e têxteis (LAURO, 1991; NAZARÉ et al., 1996; BOUVIER et al., 2003).

Desde que as indústrias passaram a substituir os corantes sintéticos pelos naturais, o Brasil se tornou um dos países com maior produção e exportação de sementes e, principalmente, de corantes a base dos pigmentos extraídos das sementes de urucum (MERCADANTE et al., 1997), provocando substancial aumento das áreas de cultivo em diferentes regiões do país, principalmente em estados das regiões norte, nordeste e centro-oeste.

Os plantios de urucum são estabelecidos, na grande maioria, a partir de plantas propagadas por sementes (SÃO JOSÉ et al., 1999a), que apresentam amplas variações na cor, forma e tamanho dos frutos produzidos, na produtividade de sementes, no teor de bixina e na resistência à pragas e doenças. Estas variações são atribuídas à predominância de polinização cruzada entre indivíduos, aos genótipos e às condições de cultivo (REBOUÇAS e SÃO JOSÉ, 1996).

Plantios clonais de alta produtividade podem ser estabelecidos mediante a propagação vegetativa de genótipos superiores de urucum, selecionados principalmente quanto à produtividade de sementes e de pigmentos, e para tanto a avaliação destas características é fundamental. Recentemente foi proposta uma metodologia para polinização artificial, visando ao melhoramento genético do urucum, observando-se diferenças significativas nos conteúdos de carotenóides totais e bixina em semente maduras das variantes estudadas (RIVERA-MADRID et al., 2006).

Desta forma, este trabalho teve como objetivos a caracterização morfológica de frutos, a avaliação da produção de sementes por fruto e do teor de bixina contido nas sementes de diferentes genótipos de urucum (*Bixa orellana* L.), a fim de fornecer subsídios para a seleção de genótipos superiores quanto a estas características.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram estudadas, no período de 2003 a 2005, dez plantas de urucum (*Bixa orellana* L.), denominadas neste trabalho de genótipos 1 a 10, com aproximadamente 12 anos de idade, cultivadas no Horto da Universidade Federal de Viçosa – UFV, MG. Estas plantas foram obtidas do cruzamento artificial entre as variedades Fruto verde piloso e Fruto vermelho liso (PINHEIRO e ALMEIDA, 1992).

Avaliou-se a morfologia dos frutos (cápsulas), a produção de sementes por fruto, o peso de 100 sementes e o teor de bixina contido nas sementes recém colhidas ou armazenadas.

2.2 Caracterização morfológica dos frutos e avaliação da produção de sementes

Foram coletadas, aleatoriamente, 50 cápsulas maduras de cada genótipo, para as avaliações das características de cor, presença de pêlos, comprimento e largura (medida com paquímetro no maior diâmetro das cápsulas), e do número de sementes por cápsula. O peso de 100 sementes foi determinado após a secagem das cápsulas em estufa a 40°C até peso constante, extração das sementes das cápsulas, homogeneização do lote de sementes de cada genótipo, preparo das amostras de 100 sementes e pesagem das amostras.

2.3 Extração e determinação do teor de bixina em sementes

Lotes de sementes dos 10 genótipos foram mantidos em estufa a 40°C, até atingirem cerca de 10% de umidade, dos quais foram retiradas amostras de sementes para extração e análise do teor de bixina. Para a análise da influência do período de armazenamento sobre a degradação da bixina, sementes de um dos genótipos (genótipo 6), foram armazenadas em

envelopes de papel pardo, com 10% de umidade e temperatura média de 22°C, por períodos de 30, 60, 90 e 120 dias.

O teor de bixina nas sementes de urucum foi determinado empregando-se a metodologia descrita por Stringheta et al. (1999). Consistiu na extração dos pigmentos das amostras de sementes com solução de KOH (hidróxido de potássio 45%) e óleo de mamona, e quantificação, mediante leitura de absorvância em espectrofotômetro ($\lambda = 480 \text{ nm}$), com conversão dos valores em porcentagem de bixina pelo fator de correção 6,97 (% de bixina = absorvância X 6,97).

Os experimentos foram repetidos uma vez em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento e 10 frutos por genótipo para as avaliações morfológicas e de produção de sementes, e 3 repetições por tratamento com 3 amostras de 25 g de sementes para cada genótipo, para os experimentos de extração e quantificação de bixina.

2.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através da ANOVA (análise da variância), aplicando-se regressão para os dados quantitativos, e o teste de Tukey a 5% de probabilidade, para a comparação das médias dos tratamentos qualitativos, utilizando-se o programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, Universidade Federal de Viçosa).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização morfológica dos frutos e produção de sementes

Os 10 genótipos avaliados produzem frutos simples, secos, indeiscentes, capsulares, loculidas, bivalvares, polispérmicos e uniloculares, e contêm sementes avermelhadas, características marcantes da espécie (MARCHIORI, 2000; JOLY, 2002). Existem, no entanto, variações expressivas na morfologia dos frutos, na produtividade de sementes e nos teores de bixina.

Quanto à cor, os frutos foram classificados como avermelhados, verdes, amarelados ou vermelhos (Figura 1). Os frutos de todos os genótipos, independentemente da cor, eram recobertos por cerdas ou pêlos, diferindo do seu genitor masculino, descrito por Pinheiro e Almeida (1992), como sendo liso (Fruto vermelho liso), o que sugere que esta característica seja uma herança monogênica e dominante.



Figura 1 – Coloração dos frutos de urucum (*Bixa orellana* L). A - Fruto avermelhado, B – Fruto verde, C – Fruto amarelado e D – Fruto vermelho.

Houve variação ($p = 0,0001$) no comprimento e na largura dos frutos dos diferentes genótipos. O genótipo 10 apresentou frutos com comprimento médio de 4,8 cm, enquanto que os frutos do genótipo 3 apresentaram em média 3,1 cm de comprimento. As larguras destes frutos variaram de 2,4 cm a 3,1 cm nos genótipos 7 e 2, respectivamente (Tabela1).

Tabela 1 – Comprimento e largura de frutos de 10 genótipos de urucum (*Bixa orellana* L)

Genótipos	Comprimento dos frutos (cm)	Largura dos frutos (cm)
1	3,7 ± 0,30 cd	2,9 ± 0,14 abc
2	3,8 ± 0,22 c	3,1 ± 0,18 a
3	3,1 ± 0,32 d	2,6 ± 0,14 bcd
4	3,6 ± 0,29 cd	2,8 ± 0,26 abcd
5	3,8 ± 0,32 c	3,0 ± 0,10 ab
6	4,7 ± 0,22 ab	2,7 ± 0,18 abcd
7	4,1 ± 0,32 bc	2,4 ± 0,22 d
8	4,5 ± 0,29 ab	2,5 ± 0,16 cd
9	4,6 ± 0,32 ab	2,9 ± 0,22 abc
10	4,8 ± 0,18 a	2,8 ± 0,18 abcd

Médias ± desvio padrão de 5 repetições de 10 frutos.

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Em função da proporção entre o comprimento e a largura, os frutos adquirem duas formas básicas: oval (largura igual ou superior a 70% do comprimento) e lanceolada (largura inferior a 70% do comprimento). Desta forma, os genótipos 1 a 5 apresentam frutos de forma oval, enquanto que os frutos dos genótipos 6 a 10 apresentam forma lanceolada.

Baseando-se nas avaliações de cor e forma dos frutos, os 10 genótipos de urucum foram reunidos e categorizados em 4 grupos (Tabela 2).

Tabela 2 – Grupos de genótipos de urucum (*Bixa orellana* L.), conforme a cor e forma dos frutos

Grupo	Cor do fruto	Forma do fruto	Genótipos
I	Avermelhada	Oval	1 – 2 – 3 - 4 – 5
II	Verde	Lanceolada	6
III	Amarelada	Lanceolada	7 – 8 – 9
IV	Vermelha	Lanceolada	10

Características morfológicas dos frutos têm sido descritas em diferentes trabalhos que visam à avaliação da produtividade, seleção de

genótipos e implantação de programas de melhoramento genético do urucum (PINHEIRO e ALMEIDA, 1992; SÃO JOSÉ et al., 1992). Estudos com diferentes genótipos nacionais relatam a existência de amplas variações, principalmente no que se refere à cor, forma e presença de pêlos nos frutos. Estes genótipos são classificados em função destas características, como Piave vermelha, Bico de pato, Verde amarelo, dentre outros, ou ainda, classificados pelo número de acesso que recebem nos bancos de germoplasma em que são depositados (SÃO JOSÉ et al., 1999b).

Outras características avaliadas nos 10 genótipos estudados também apresentaram variações. O número médio de sementes por fruto variou ($p=0,0001$) de 41,5, no genótipo 1, a 50,6, no genótipo 7 (Tabela 3). Pinheiro e Almeida (1992), ao avaliarem esta mesma característica nos genitores destes 10 genótipos, identificaram que o feminino (Fruto verde piloso) produziu, em média, 56,7 sementes por fruto, e o genitor masculino (Fruto vermelho liso) 48 sementes por fruto, em média.

Tabela 3 – Número de sementes por fruto e peso de 100 sementes, de 10 genótipos de urucum (*Bixa orellana* L)

Genótipos	Sementes por fruto (Nº)	Peso de 100 sementes (g)
1	41,5 ± 1,88 b	1,35 ± 0,20 bcd
2	45,6 ± 2,55 ab	2,24 ± 0,40 a
3	46,3 ± 1,57 ab	1,15 ± 0,44 cd
4	44,9 ± 1,11 ab	1,10 ± 0,09 d
5	44,9 ± 4,70 ab	1,35 ± 0,19 bcd
6	49,7 ± 2,05 a	1,75 ± 0,07 abcd
7	50,6 ± 1,53 a	1,98 ± 0,22 ab
8	48,2 ± 2,10 a	1,80 ± 0,52 abc
9	49,2 ± 3,00 a	1,66 ± 0,02 abcd
10	41,7 ± 3,53 b	1,64 ± 0,11 abcd

Médias ± desvio padrão de 5 repetições de 10 frutos.

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Neste trabalho, destacam-se os genótipos 6, 7, 8 e 9 como os mais produtivos, quando comparados ao genitor masculino. No entanto, todos os genótipos apresentaram maior número de sementes por fruto que a média de 40,7 relatada para diferentes genótipos avaliados em ensaio no estado da Bahia (SÃO JOSÉ et al., 1999b). Alta produtividade de sementes por fruto é de fundamental importância no cultivo de urucum, pois reflete na maior produtividade por planta e, conseqüentemente, por área cultivada, sendo

uma das características de maior interesse nos programas de melhoramento genético da espécie.

Houve variação também no peso de 100 sementes ($p = 0,00004$), de 1,1 g, no genótipo 4, a 2,24 g, no genótipo 2 (Tabela 3).

3.2 Teor de bixina em sementes

Os teores médios de bixina, presentes nas sementes dos 10 genótipos de urucum (Figura 2), variam ($p = 0,0001$), de 5,05% (genótipo 6 – Fruto verde) a 3,7% (genótipo 10 – Fruto vermelho). Para os 4 grupos de genótipos estudados, as médias dos teores de bixina foram de 4,49% (Grupo I - Fruto avermelhado), 5,05% (Grupo II - Fruto verde), 4,11% (Grupo III - Fruto amarelado) e 3,7% (Grupo IV - Fruto vermelho). Não existem relatos disponíveis na literatura sobre o teor de bixina presente nas sementes dos genitores dos 10 genótipos estudados neste trabalho, não sendo possível, portanto, estabelecer comparações entre eles.

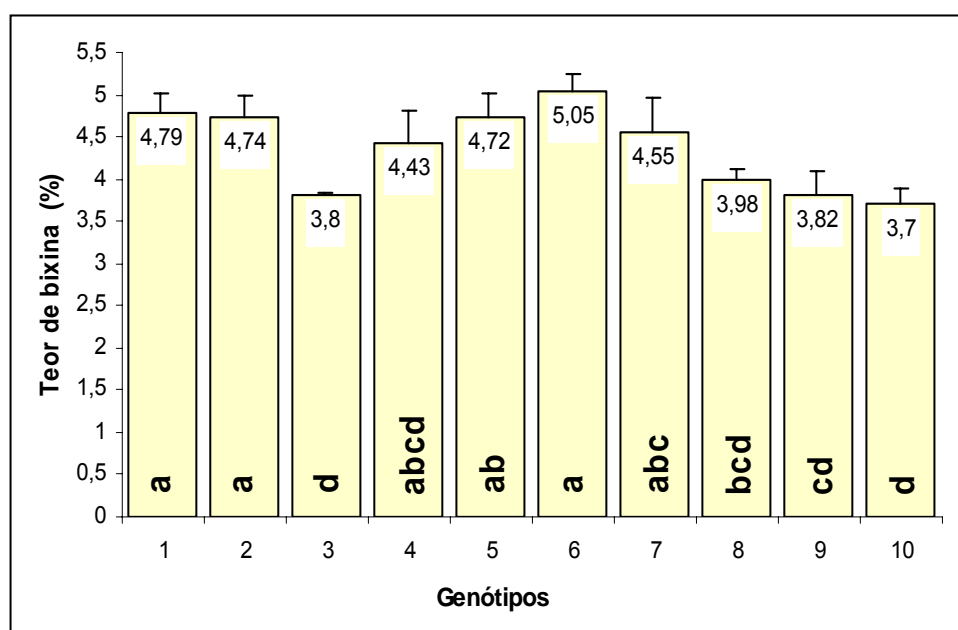


Figura 2 – Teor de bixina em sementes de 10 genótipos de urucum (*Bixa orellana* L.). Médias acompanhadas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Barras verticais indicam desvios das médias.

Os constituintes químicos de dois híbridos de urucum, também denominados de Fruto verde viloso e Fruto vermelho, foram analisados por

Oliveira et al. (1999), que identificaram teores de bixina de 3,1% e 4,8%, respectivamente; no entanto, foi utilizado o hidróxido de sódio a 0,01N como solução extratora de pigmentos.

Os genótipos 1, 2, e 6 apresentaram os maiores teores de bixina nas sementes, não diferindo estatisticamente, no entanto, dos genótipos 4, 5, e 7. Estes genótipos apresentam teores de bixina superiores à média relatada para diferentes cultivares nacionais. São José et al. (1999b) identificaram, entre 30 acessos de urucum, de um banco de germoplasma no estado da Bahia, teores de bixina que variaram de 0,96% a 4,44%. Franco et al. (2002), analisando também cultivares nacionais, relataram teores de bixina que variaram de 1,7% a 4%.

Assim, foi possível neste trabalho selecionar, entre os 10 genótipos estudados, aqueles com maiores teores de bixina. Esta é uma das características mais valorizadas do ponto de vista do melhoramento genético da espécie, pois avanços consideráveis têm sido alcançados quando cruzamentos são dirigidos entre indivíduos que expressam superioridade na produtividade de sementes e alto conteúdo de bixina (SÃO JOSÉ et al., 1999a).

O teor de bixina decresceu em função do período de armazenamento das sementes (Figura 3). A análise das sementes armazenadas por 120 dias, mostra que houve uma redução de aproximadamente 23% do conteúdo de bixina, quando comparadas às sementes recém colhidas. A taxa de degradação dos pigmentos foi variável entre os tempos de armazenamento.

A estabilidade dos corantes naturais pode ser afetada pela luz e pelo oxigênio, como demonstrado em ensaios com extratos de urucum (PIMENTEL e STRINGHETA, 1999), porém, alta temperatura parece ser o fator mais importante de degradação dos pigmentos em sementes intactas (PONTE et al., 1999). Como todas as amostras de sementes permaneceram nas mesmas condições de umidade, temperatura, e também protegidas da luz durante todo o experimento, as reduções dos teores de bixina podem ser atribuídas ao tempo de armazenamento.

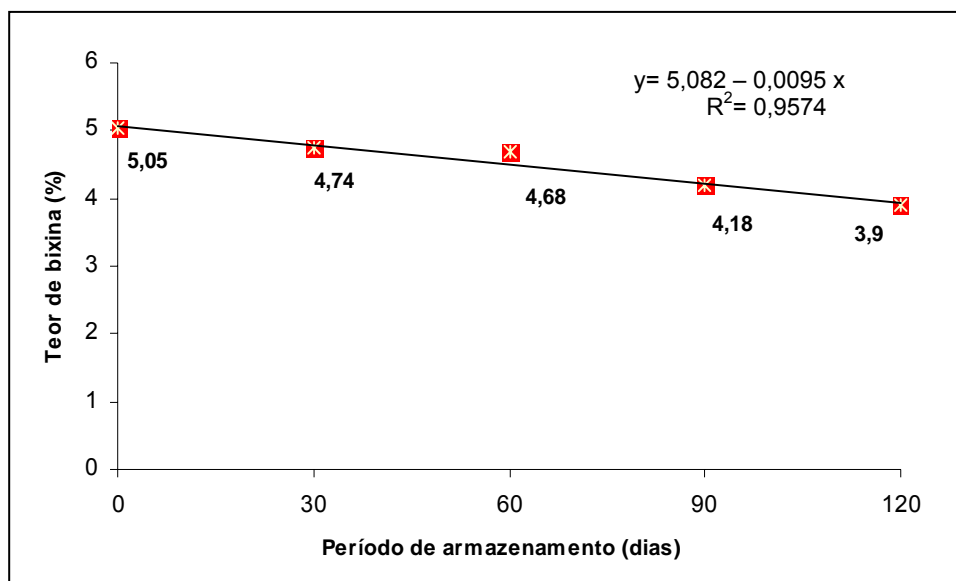


Figura 3 – Variação no teor de bixina em sementes de urucum (*Bixa orellana* L), genótipo 6 (Fruto verde piloso), armazenadas por diferentes períodos de tempo.

As variações encontradas na cor e tamanho dos frutos, no número e peso de sementes, e no teor de bixina, entre os 10 genótipos estudados, foram também observadas em outros genótipos (REBOUÇAS e SÃO JOSÉ, 1996), sendo características da espécie. A variabilidade genética destes 10 genótipos foi estudada por meio de marcadores isoenzimáticos (RODRIGUES, 1995), no entanto, a análise cariotípica indicou que estes genótipos pertencem a uma mesma espécie, *Bixa orellana* L. (Carvalho, 2000).

Variações genéticas existentes entre genótipos de uma mesma espécie são bastante úteis, pois conferem a ela comportamentos distintos em um determinado local. Porém, as grandes variações encontradas entre genótipos de urucum, no que se refere à produção de sementes e ao teor de bixina, representam problemas do ponto de vista da produção de corantes em grande escala. A seleção de genótipos superiores para estas características poderá contribuir para a orientação de futuros cruzamentos visando à obtenção de híbridos heteróticos e o melhoramento da espécie. Metodologias adequadas de propagação vegetativa serão necessárias para a fixação e perpetuação destas combinações híbridas desejadas.

4 CONCLUSÕES

Existem variações na cor, comprimento, largura e forma dos frutos, no número de sementes por fruto, no peso de 100 sementes e no teor de bixina presente nas sementes dos genótipos de *Bixa orellana* L.

As avaliações de produção de sementes e dos teores de bixina possibilitam selecionar plantas superiores em relação a estas características. Destacam-se os genótipos 6, 7, 8, e 9 por produzirem mais de 49 sementes por fruto e, os genótipos 1, 2, 5 e 6 com teores de bixina acima de 4,7%. O teor de bixina decresce em sementes armazenadas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CÂMARA, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, v. 300, p. 2089-2091, 2003.
- CARVALHO, J.F.R.P. **Análise cariotípica e indução *in vitro* de poliploidia em urucum (*Bixa orellana* L.)**. Viçosa: MG, 2000. 124p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- FRANCO, C.F. de O.; SILVA, F. de C.P. da; CAZÉ FILHO, J.; BARREIRO NETO, M.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, R.N.H.; FONTINÉLLI, I.S.C. **Urucuzeiro: agronegócios de corantes naturais**. Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S.A., João Pessoa. 2002. 120 p.
- JAKO, C.; COUTU, C.; ROEWER, I.; REED, D.W.; PELCHER, L.E.; COVELLO, P.S. Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis. **Plant Science**, v. 163, p. 141-145, 2002.
- JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. 777 p.
- KIOKIAS, S.; GORDON, M.H. Antioxidant properties of annatto carotenoids. **Food Chemistry**, v. 83, p. 523-529, 2003.
- LAURO, G.J. A primer on natural colors. **Cereal Foods World**, v. 36, n. 11, p. 949-953, 1991.
- MARCHIORI, J.N.C. **Dendrologia das angiospermas: das bixáceas às rosáceas**. Santa Maria: Editora UFSM, 2000. 240 p.
- MERCADANTE, A.Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1050-1054, 1997.
- MERCADANTE, A.Z.; PFANDER, H. Carotenoids from annatto: a review. **Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, p. 79-91, 1998.
- NAZARÉ, R.F.R. de; ALVES, S. de M.; BARBOSA, W.C.; RODRIGUES, I. A.; FARIA, L.J.G.; KUKUHARA, K. Estudo para identificação de vegetais produtores de corantes, ocorrentes na flora amazônica. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (Belém-PA). **Geração de tecnologia para o desenvolvimento do Trópico Úmido**. Belém: EMBRAPA-CPATU/JICA. 1996.
- OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; ALMEIDA, E.C.. Determinação dos constituintes químicos de dois cultivares do urucum (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 3, p. 91-95, 1999.
- PIMENTEL, F.A.; STRINGHETA, P.C.. Influência da luz e do oxigênio sobre a estabilidade do norbixinato de potássio em presença de maltodextrina. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 3, p. 21-26, 1999.

PINHEIRO, A.L.; ALMEIDA, E.C. de. Avaliação de um híbrido artificial obtido entre duas variedades de urucum (*Bixa orellana* L.) em Viçosa – Minas Gerais. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, n. 1, p. 31-35, 1992.

PONTE, M.X.; SILVA, K.S.M.; JUNIOR, W.P. Estudo da fotodegradação da bixina em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 3, p. 11-16, 1999.

REBOUÇAS, T.N.H.; SÃO JOSÉ, A.R. **A cultura do urucum: práticas de cultivo e comercialização**. Vitória da Conquista- BA: DFZ/UESB/SBCN, 1996. 42p.

RIVERA-MADRID, R.; ESCOBEDO-G.M., R.M.; BALAM-GALERA, E.; VERA-KU, M.; HARRIES, H. Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 106, p. 165-172, 2006.

RODRIGUES, J.P.F. **Análise de isoenzimas em progênies de meio-irmãos de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Viçosa: MG, 1995. 76p. Tese (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.

SÃO JOSÉ, A.R.; MASCARENHAS, J.M.O.; STRINGHETA, P.C.; REBOUÇAS, T.N.H.; OLIVEIRA, V.P. de. Cultivo del achiote (*Bixa orellana* L.) en Brasil. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 3, p. 113-119, 1999 a.

SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; MORAIS, O.M.; ATAÍDE, E.M. Colecta y conservacion de germoplasma de achiote (*Bixa orellana* L.) en el estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 3, p. 17-20, 1999 b.

STRINGHETA, P.C.; MASCARENHAS, J.M.O.; PONTES, L.V.; SILVA, J.N.; REIS, F.P. Determination of the contents of bixin in seeds of annatto (*Bixa orellana* L.) under different temperatures. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 3, p. 47-52, 1999.

CAPÍTULO II

RESGATE VEGETATIVO E PRODUÇÃO DE EXPLANTES DE *Bixa orellana* L. PARA PROCESSOS DE PROPAGAÇÃO CLONAL

RESUMO

Foram avaliadas as técnicas de estaquia, hidroponia e alporquia como formas de resgate vegetativo de genótipos de urucum (*B. orellana* L.), visando à produção de explantes e de plantas fornecedoras de explantes, para processos de propagação clonal. Através da técnica de estaquia convencional não foi possível a indução rizogênica ou a formação de brotos aproveitáveis em estacas, independentemente da época do ano, substrato, concentrações e tempos de exposição das estacas ao AIB. Em sistema hidropônico, estacas apicais ou basais de ramos, que receberam na extremidade apical 10 mg.L⁻¹ de BAP em lanolina, formaram de 1,8 a 4,2 brotos por estaca. Brotos formados em estacas basais apresentaram maior crescimento (35 mm), podendo ser aproveitados em sistemas de propagação clonal. A adição de AIB 10 mg.L⁻¹ na solução nutritiva não induziu o enraizamento das estacas. A técnica de alporquia proporcionou o enraizamento de ramos dos 10 genótipos avaliados, com eficiência que variou de 20% a 100% (média de 64,5% de alporques enraizados). A sobrevivência destes alporques foi de 100% após o plantio. Em casa de vegetação, os alporques desenvolveram ramos a partir da brotação de gemas caulinares, constituindo estoques de explantes apropriados para serem utilizados como estacas ou segmentos nodais para o cultivo *in vitro* desta espécie.

Palavras-chave: estaquia, hidroponia, alporquia, brotos axilares, BAP, AIB.

1 INTRODUÇÃO

O urucum, *Bixa orellana* L. (família Bixaceae), é uma planta lenhosa, originária da América Tropical (JOLY, 2002), nativa nas florestas Amazônica e Atlântica (MARCHIORI, 2000), cultivada em diferentes regiões do Brasil (SÃO JOSÉ et al., 1999), onde também é conhecida como urucu, açafroa e açafroeira da terra.

Diferentes partes desta planta são utilizadas na medicina popular (IROBI et al., 1996). No entanto, as sementes despertam maior interesse por serem fontes dos pigmentos carotenóides bixina e norbixina, amplamente utilizados pelas indústrias processadoras de alimentos, farmacêuticas e têxteis (LAURO, 1991; NAZARÉ et al., 1996; BOUVIER et al., 2003). Os pigmentos carotenóides de urucum estão entre os 13 produtos naturais permitidos para o consumo humano (COLLINS e HUGHES, 1991).

Apesar do Brasil ser um dos maiores produtores e exportadores de corantes a base de sementes de urucum (MERCADANTE et al., 1997), os teores de pigmentos encontrados nas sementes, da maioria das variedades cultivadas no país, são inferiores àqueles desejados para o comércio (LIMA, 1991). As plantações de urucum são estabelecidas predominantemente a partir de plantas propagadas por sementes (SÃO JOSÉ et al., 1999), e como a espécie é de polinização predominantemente cruzada, as progênies exibem alta variabilidade genética, refletindo em desuniformidade fenotípica e grande variação na produtividade de sementes e na composição dos pigmentos no produto final da extração (REBOUÇAS e SÃO JOSÉ, 1996).

Técnicas tradicionais de propagação vegetativa apresentam custos elevados, devido à baixa eficiência, quando utilizadas para a produção em grande escala de plantas de urucum (SÃO JOSÉ et al., 1999). Alternativamente, estudos têm sido desenvolvidos visando a sua propagação (BRUCKNER et al., 1991), incluindo-se técnicas *in vitro* (VIEIRA et al., 2000; D'SOUZA e SHARON, 2001; SHA VALLI KHAN et al., 2002; PAIVA NETO et al., 2003a, b, c; CARVALHO et al., 2005).

A utilização eficiente de técnicas de propagação vegetativa depende, sobretudo, da qualidade fisiológica e fitossanitária do material a ser propagado. Os maiores desafios para a propagação vegetativa de espécies

lenhosas são o envelhecimento ontogenético dos tecidos (THORPE et al., 1991) e a presença de microrganismos contaminantes, especialmente em explantes adultos coletados de plantas em condições de campo (NIEDZ e BAUSHER, 2002), pois refletem na baixa capacidade regenerativa, além de elevados níveis de contaminação do material vegetal *in vitro*. Alternativas para a reversão e controle destes processos, aumentando ou induzindo a competência celular e promovendo melhor controle fitossanitário dos explantes, foram utilizadas com sucesso para algumas espécies lenhosas (ASSIS e TEIXEIRA, 1998; MANTOVANI et al., 1999; ALFENAS et al., 2004). Entretanto, são raros os trabalhos publicados na literatura visando elucidar os diversos aspectos envolvidos na propagação vegetativa do urucum, e que forneçam subsídios que possam ser utilizados em processos de propagação clonal desta espécie.

Dessa forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar as potencialidades das técnicas de estaquia convencional e em sistema hidropônico, e da alporquia, como formas de resgate vegetativo de genótipos de urucum (*B. orellana* L.), visando à produção de explantes e de plantas fornecedoras de explantes, que possam ser utilizados em processos de propagação clonal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram estudados dez genótipos de urucum (*Bixa orellana* L.), denominados neste trabalho de genótipos 1 a 10. Esses foram obtidos a partir do cruzamento artificial entre as variedades Fruto verde piloso e Fruto vermelho liso (PINHEIRO e ALMEIDA, 1992), e são cultivados no Horto da Universidade Federal de Viçosa – UFV, MG.

As 10 plantas de urucum, com idade aproximada de 12 anos, tiveram o tronco podado a 40 cm do solo, para a indução de novos ramos. Os ramos formados, com idade de 3 anos, foram utilizados para os diferentes experimentos. Foi realizada uma adubação, 60 dias antes do início dos experimentos, diretamente no solo, na região de projeção da copa de cada planta, com sulfato de amônia (225 g), cloreto de potássio (160 g) e super fosfato simples (260 g). O controle de fungos nestas plantas foi feito com solução de fungicida Score (0,04% v/v), através de pulverizações foliares em períodos bimestrais.

Os experimentos foram realizados na Universidade Federal de Viçosa, no período de 2003 a 2005.

2.2 Estaquia convencional

Estacas, com aproximadamente 15 cm de comprimento foram retiradas das posições apical (1 cm de diâmetro) e basal (2 cm de diâmetro) dos ramos dos 10 genótipos estudados. Foram investigados, em 3 experimentos, diferentes fatores que interferem no processo de enraizamento das estacas.

Experimento 1: imersão da base das estacas em solução de ácido indol-3-butírico (AIB) a 0, 100, 200, 500 e 1000 mg.L⁻¹ por 10 e 15 segundos, e estaqueamento em recipientes do tipo tubete, contendo substrato Plantmax[®].

Experimento 2: imersão da base das estacas em solução de AIB a 0 e 1000 mg.L⁻¹, por 15, 30, 60, e 120 segundos, e estaqueamento em tubetes contendo substrato Plantmax[®].

Experimento 3: imersão da base das estacas em solução de AIB a 0, 1000 e 2000 mg.L⁻¹, por 15 segundos, e estaqueamento em tubetes contendo substrato Plantmax[®] e em canteiro com areia grossa lavada.

Os experimentos foram repetidos em duas épocas do ano: em janeiro (período chuvoso) e julho (período de estiagem), conduzidos em casa de vegetação com nebulização intermitente de 10 minutos a cada 2 horas, no delineamento blocos ao acaso com 4 repetições e 10 estacas por parcela.

2.3 Indução de brotações e enraizamento de estacas em sistema hidropônico

As estacas, com aproximadamente 15 cm de comprimento, foram obtidas de ramos de duas plantas, genótipo 2 (Fruto avermelhado piloso) e genótipo 6 (Fruto verde piloso), selecionadas entre os 10 genótipos estudados no capítulo I, por apresentarem os maiores teores de bixina nas sementes. As estacas foram desinfestadas com soluções de hipoclorito de sódio a 0,25% (v/v), por 60 segundos, e posteriormente com fungicida Benlate 0,02% (p/v), por 30 minutos.

As estacas foram cultivadas em sistema de hidroponia com oxigenação, em caixas de isopor de capacidade de 5 L, revestidas externamente com papel alumínio e internamente com sacos plásticos. As estacas foram fixadas em orifícios nas tampas das caixas. Utilizou-se a solução nutritiva de Hoagland, com volume e pH (5,8) ajustados semanalmente. Testou-se dois tipos de estacas, em relação à posição no ramo: estacas apicais (1 cm de diâmetro) e basais (2 cm de diâmetro); e os reguladores de crescimento AIB (0 e 10 mg.L⁻¹), adicionado à solução nutritiva, e BAP (6 –benzilaminopurina, a 0 e 10 mg.L⁻¹), aplicado em lanolina na extremidade apical das estacas.

Após 30, avaliou-se a frequência de enraizamento e número de brotações por estaca. O experimento foi repetido uma vez, em delineamento blocos ao acaso, com 4 repetições e 6 estacas por parcela.

2.4 Alporquia

Alporques foram feitos em ramos de 1 a 2 cm de diâmetro, dos 10 genótipos estudados, mediante o anelamento da casca (1 cm de largura), aplicação de solução de AIB a 1000 mg.L^{-1} em papel filtro, recobrimento da região anelada com substrato composto de uma mistura de vermiculita e musgo (*Sphagnum* sp.), e proteção destes com plásticos transparentes.

Após o desenvolvimento de um sistema radicular adequado, os alporques foram destacados das plantas, através do corte logo abaixo da região do anelamento, plantados em vasos de plástico com capacidade de 5 L contendo substrato Plantmax[®], e mantidos em casa de vegetação sob controle fitossanitário e nutricional.

O experimento foi repetido uma vez em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições por genótipo (tratamento), cada uma constituída de 5 alporques, totalizando 20 alporques por genótipo. Avaliou-se a frequência de alporques enraizados por genótipo, aos 30 dias depois do seu preparo e a frequência de sobrevivência, aos 30 dias depois do plantio e transferência dos alporques para casa de vegetação.

2.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados obtidos nos diferentes experimentos foram realizadas através da ANOVA (análise da variância), e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, Universidade Federal de Viçosa).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estaquia convencional

O processo rizogênico não foi induzido nas estacas de urucum, independentemente do tipo de estaca, época do ano, substrato, concentrações e tempos de exposição das estacas ao AIB, nos diferentes experimentos realizados.

Durante o estaqueamento do urucum ocorreu intensa exsudação de compostos mucilaginosos na base das estacas, independentemente do tipo de estaca e da época do ano, fato que pode ter provocado efeito negativo no estímulo ao enraizamento. A intensa lixiviação de substâncias mucilaginosas e fenólicas que ocorre na extremidade cortada de estacas de urucum, segundo D'Souza e Sharon (2001), dificulta o enraizamento e limita a propagação vegetativa desta espécie através da estaquia convencional. A anatomia do eixo vegetativo de urucum revela a presença de numerosos canais secretores, contendo substâncias mucilaginosas, que percorrem todo o corpo da planta, o que reflete na intensa exsudação destes compostos (SOUZA, 1999).

Ao longo do período de avaliação do experimento observou-se o escurecimento gradativo das estacas, a necrose e morte dos tecidos. Estes processos ocorreram depois do corte das estacas, resultante do ferimento dos tecidos, e provavelmente são desencadeados devido à ativação da síntese de compostos fenólicos, catalisados por enzimas como a fenilalaninamonioliase, uma enzima-chave da produção de fenóis (PERES e KERBAUY, 1999), e pela oxidação destes compostos em contato com o ar durante a preparação das estacas.

Segundo Coll et al. (1992), o sinergismo entre AIA endógeno e compostos fenólicos, presentes no material vegetal, pode aumentar a atividade da auxina, através da sua proteção contra a destruição pela AIA-oxidase, ou diminuir sua atividade, pelo aumento da atividade da enzima que a degrada. Além deste sinergismo, a oxidação dos compostos fenólicos, catalisada por fenolases e oxidases, resulta em produtos tóxicos, como as

quinonas, que são altamente ativas e podem inibir o processo rizogênico (GEORGE e SHERRINGTON, 1984; DEBERGH e READ, 1991).

Embora a técnica de estaquia seja amplamente utilizada para propagação de plantas lenhosas, tornando-se indispensável nos programas de melhoramento genético de espécies como eucalipto, por exemplo, (ALFENAS et al., 2004), existem fatores que influenciam no processo de enraizamento de estacas, que são inerentes ao material vegetal e também àqueles relacionados às condições do ambiente de estaqueamento (HARTMANN et al., 1997).

Uma das maiores dificuldades para a propagação vegetativa de espécies lenhosas é a redução ou perda da capacidade morfogênica dos tecidos, resultante do processo de maturação que ocorre durante o desenvolvimento ontogenético da planta (THORPE et al., 1991). A presença de substâncias inibidoras da iniciação radicular, como as citocininas, e a ausência de resposta do tecido à auxina acumulada (TREWAVAS, 1981), provocada provavelmente pela falta de receptores para esta classe hormonal (CARRY et al., 2001), são, além dos fatores já citados anteriormente, também responsáveis pela recalcitrância de muitas espécies lenhosas em formar raízes. Por outro lado, o enraizamento da maioria dos materiais recalcitrantes tem sido obtido com relativo sucesso através do tratamento de estacas com auxinas sintéticas, principalmente o ácido indol-3-butírico (AIB), porém nem sempre o processo rizogênico é induzido, como demonstrado neste trabalho com estacas de urucum.

Nos primeiros 15 dias dos experimentos, estacas de urucum com maior diâmetro formaram brotos a partir do desenvolvimento das gemas axilares. Os brotos apresentaram crescimento médio inferior a 15 mm e não mantiveram o potencial de crescimento que permitisse seu aproveitamento em processos de propagação clonal, provavelmente devido à exaustão das reservas nutricionais das estacas, já que estas não desenvolveram sistema radicular que pudesse absorver água e nutrientes de forma mais eficiente.

3.2 Indução de brotações e enraizamento de estacas em sistema hidropônico

Estacas de urucum em sistema hidropônico desenvolveram brotos a partir de gemas caulinares. A intensidade de formação destes brotos foi influenciada pelo genótipo e pela classe de regulador de crescimento, sendo que houve interação significativa entre estes dois fatores (Tabela 1).

Nas estacas do genótipo 6 (Fruto verde piloso) ocorreu maior número de brotações, quando comparado às estacas do genótipo 2 (Fruto avermelhado piloso), salvo quando se utilizou o AIB, quando a diferença entre as médias não foi significativa (Tabela 1).

Tabela 1 – Influência do regulador de crescimento sobre o número de brotações emitidas em estacas de dois genótipos de *Bixa orellana* L., aos 30 dias de cultivo em sistema hidropônico

Reguladores	Brotações (N°)*	
	Genótipo 2 (Fruto avermelhado piloso)	Genótipo 6 (Fruto verde piloso)
Controle	B 0,6 ± 0,5 b	A 1,3 ± 0,7 b
AIB 10 mg.L ⁻¹	A 0,5 ± 0,5 b	A 0,9 ± 0,3 b
BAP10 mg.L ⁻¹	B 1,8 ± 0,3 a	A 4,2 ± 0,7 a

Médias ± desvio padrão de 4 repetições de 6 estacas

Médias precedidas da mesma letra na linha, e seguidas da mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

*Dados transformados em raiz ($x+0,5$)

O BAP, aplicado em lanolina na extremidade apical das estacas, estimulou a formação de brotos, nos dois genótipos testados, induzindo em média, 4,2 brotos por estaca (genótipo 6) e 1,8 brotos por estaca (genótipo 2), sendo mais efetivo do que o AIB e o controle neste processo (Tabela 1). Desta forma, a aplicação de BAP, no ápice das estacas, é uma prática viável para aumentar a disponibilidade de brotos de urucum. O mesmo efeito do BAP foi também verificado em canela sassafrás (JANKOWSKI e GRAÇA, 1993) e caixeta (MANTOVANI et al., 1999), em que a citocinina estimulou a formação de brotos laterais nos ramos, aumentando a disponibilidade e promovendo o rejuvenescimento dos explantes que foram utilizados posteriormente para a propagação *in vitro* destas espécies.

Não houve diferença significativa entre estacas apicais e basais de urucum, nem interação deste fator com os demais testados, porém, estacas

basais, de maior diâmetro, desenvolveram brotos maiores (média de 35 mm de altura), que sobreviveram por mais tempo em solução hidropônica, provavelmente em função de uma maior reserva nutricional nestas estacas. O crescimento alcançado pelos brotos foi suficiente para o seu aproveitamento em sistemas de propagação clonal, como estacas ou como segmentos nodais, para o cultivo *in vitro*.

Em períodos de cultivo superiores a 40 dias em solução hidropônica, ocorreram processos de senescência de folhas, murcha e morte dos brotos, provavelmente em função da exaustão das reservas nutricionais das estacas neste período. Para o melhor aproveitamento destes brotos é necessário, portanto, excisá-los das estacas antes de completarem 40 dias.

O AIB, em solução hidropônica, não promoveu a formação de raízes nas estacas dos dois genótipos de urucum estudados, embora esta seja uma prática utilizada para a indução de raízes adventícias em estacas de certas espécies lenhosas em sistemas hidropônicos, como por exemplo, o eucalipto (WILKINSON, 1994).

Durante o período de condução do experimento ocorreu intensa exsudação de compostos mucilaginosos da base das estacas de urucum, da mesma forma que no sistema de estaqueamento convencional. Já nas primeiras horas de cultivo, verificou-se a deposição destes compostos no fundo dos recipientes. Este processo alterou o pH da solução nutritiva de 5,8 para 3,7, fato que pode ter interferido no processo rizogênico. Medidas como o ajuste diário do pH da solução e a adição do antioxidante PVP (polivinilpirrolidona a 0,05%) à solução hidropônica, sugerido por Silva (1998) para o enraizamento via sistema hidropônico de estacas de eucalipto, não foram efetivas para controlar este problema em urucum.

3.3 Alporquia

A técnica de alporquia possibilitou com sucesso o resgate vegetativo de todos os genótipos estudados. Os resultados obtidos com esta técnica mostram que houve variação ($p = 0,0001$) entre os 10 genótipos, na frequência de alporques enraizados, variando de 20% a 100% (Figura 1). Nos genótipos 5 e 10, 100% de alporques enraizaram. Somente os

genótipos 1 e 2 apresentaram freqüência de enraizamento inferior a 50% (20% e 35%, respectivamente).

Em testes preliminares realizados com estes mesmos genótipos, o processo rizogênico não foi induzido em alporques na ausência de auxina (AIB). O uso do AIB é prática comum no enraizamento de estacas de espécies lenhosas, sendo que seu efeito positivo tem sido comprovado também na indução do enraizamento de alporques, como por exemplo, em jameiro rosa (MARTINS e ANTUNES, 2000). Em urucum, o uso de AIB para a indução do enraizamento de alporques não era conhecido.

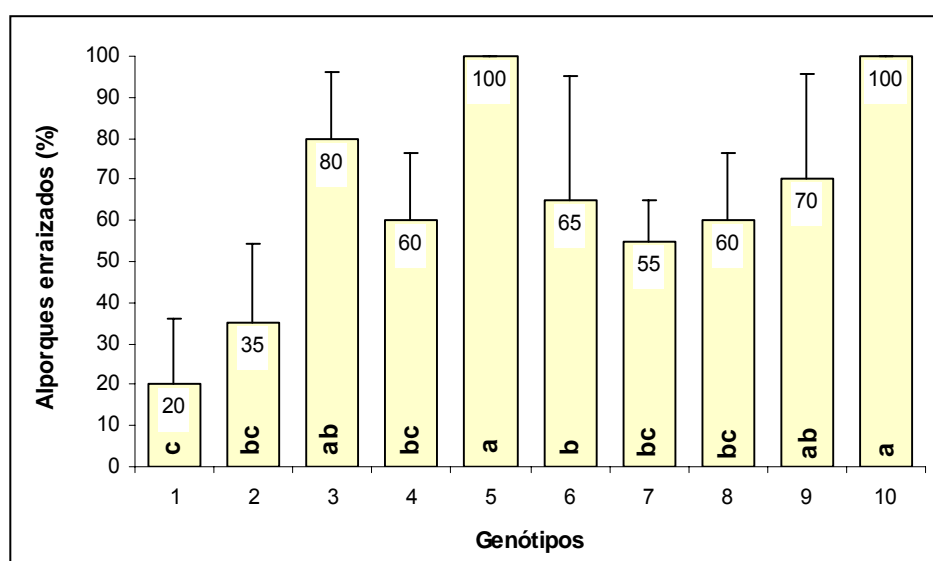


Figura 1 – Freqüência de alporques enraizados de dez genótipos de *Bixa orellana* L., após 30 dias, na presença de AIB a 1000 mg.L^{-1} . Médias acompanhadas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Barras verticais indicam desvios das médias. Dados transformados em arco sen [$\text{raiz}(x/100)$].

A velocidade de enraizamento dos alporques foi semelhante entre os genótipos. Após o processo de anelamento, aplicação do AIB e formação do alporque (Figura 2A), os primeiros sinais da rizogênese se tornaram visíveis aos 10 dias (Figura 2B). Os primórdios radiculares emergiram através da casca, na região intumescida acima do anelamento, e tiveram desenvolvimento geotropicamente positivo, em todos os alporques. Raízes brancas, de diferentes diâmetros, com comprimentos variados, se tornaram evidentes aos 20 dias (Figura 2C). Aos 30 dias, os alporques apresentaram sistema radicular bastante desenvolvido, com raízes longas, claras e bem

formadas (Figura 2D), sendo possível destacá-los da planta para posterior plantio em vasos. O processo rizogênico, em todos os genótipos, não foi acompanhado pela formação de calos.

O anelamento do ramo provoca interrupção do transporte no floema e, devido ao transporte basípeto, as auxinas endógenas podem se acumular naquela região, onde posteriormente raízes adventícias são formadas. Em testes preliminares, quando o anelamento da casca foi feito de forma parcial, poucos primórdios radiculares se formaram e sem desenvolvimento posterior.

Os processos de indução e desenvolvimento radicular nos alporques foram favorecidos pela proteção dos ramos com material impermeável, como o plástico, independentemente da cor, pois materiais porosos, utilizados em testes preliminares, provocaram ressecamento do substrato pela intensa evaporação de água, não permitindo o adequado desenvolvimento do sistema radicular.

Como forma de propagação vegetativa, o enraizamento de alporques está sujeito aos mesmos fatores que interferem no enraizamento de estacas, embora a condição do ramo a ser enraizado, de estar ligado à planta matriz, com fornecimento de água e nutrientes via xilema, e de compostos sintetizados nas folhas via floema, possa favorecer o processo rizogênico. Durante a realização dos alporques de urucum não se verificou a exsudação de mucilagens dos ramos anelados, ao contrário do observado durante o processo de estaquia, fato que pode também ter favorecido o processo rizogênico nos alporques.

A alporquia tem proporcionado bons resultados para a propagação de diferentes espécies lenhosas, como umbuzeiro e gravioleira (LEDERMAN et al., 1991), e pessegueiro (CASTRO e SILVEIRA, 2003).

Todos os alporques sobreviveram após o plantio e, em casa de vegetação, sob controle fitossanitário e nutricional, desenvolveram brotações (Figura 2E e F), se constituindo em estoque de explantes apropriados para serem utilizados no cultivo *in vitro* do urucum. Os alporques podem ainda ser utilizados em sistemas de jardins clonais, como cepas fornecedoras de estacas.

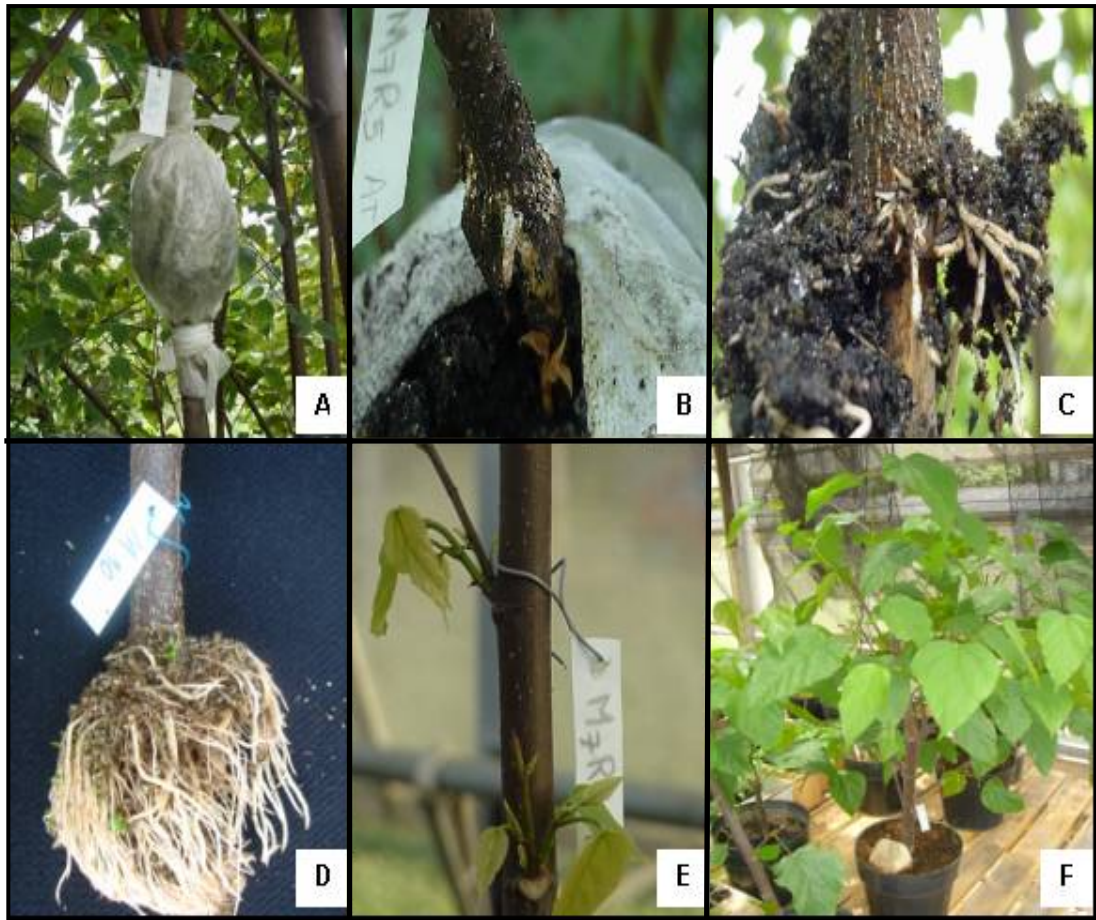


Figura 2 - Desenvolvimento do sistema radicular em alporques, com aplicação de AIB a 1000 mg.L^{-1} , e produção de explantes para processos de propagação clonal do urucum (*Bixa orellana* L). A – Alporque em ramo ligado à planta-matriz; B – Desenvolvimento dos primórdios radiculares na região entumescida do ramo, a cima do anelamento, aos 10 dias; C – Desenvolvimento radicular em alporque ligado à planta-matriz, aos 20 dias; D – Alporque enraizado, aos 30 dias, destacado da planta-matriz; E – Brotos em alporque em casa de vegetação; F – Alporques enraizados com ramos desenvolvidos em casa de vegetação.

4 CONCLUSÕES

O resgate vegetativo de genótipos de *B. orellana* L. e a produção de explantes podem ser realizados através da alporquia e da indução de brotações em estacas em sistema hidropônico. Com a aplicação destas técnicas é possível propagar genótipos de interesse, estabelecendo plantas matrizes que podem ser mantidas em casa de vegetação sob condições adequadas de nutrição e fitossanidade, possibilitando a manutenção de estoques de explantes a serem utilizados em processos de propagação clonal.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 422 p.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v 1, 1998. p. 261-296.
- BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CÂMARA, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, v. 300, p. 2089-2091, 2003.
- BRUCKNER, C.H.; KHOURI, S.S.; MELGAÇO, A.V. Propagação do urucueiro (*Bixa orellana* L.) por meio de cinco modalidades de enxertia. **Revista Ceres**, v. 38, p. 340-344, 1991.
- CARRY, A.; UTTAMCHANDANI, S.J.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.A.; HOWELL, S.H.H. Arabidopsis mutants with increased organ regeneration in tissue culture are more competent to respond to hormonal signals. **Planta**, v. 213, p. 700-7007, 2001.
- CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, n. 1, p. 69-75, 2005.
- CASTRO, L.A.S.; SILVEIRA, C.A.P. Propagação vegetativa do pessegueiro por alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 368-370, 2003.
- COLL, J.B.; RODRIGO, G.N.; GARCÍA, B.S.; TAMÉS, R.S. **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Madrid: Ediciones Pirámide S.A., 1992.
- COLLINS, P.; HUGHES, S. Natural colours – a question of stability. In COLLINS, G.B., SHEPHERD, R.H. (Eds.). **Prospectives in natural food symposium**. London: Overseal Food Ltd, 1991. p. 1-10
- DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C., ZIMMERMAN, R.H. (Eds.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 1-13
- D'SOUZA, M.C.; SHARON, M. *In vitro* clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 37, p. 168-172, 2001.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. England: Eastern Press, 1984, 709 p.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JÚNIOR, F. T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall, 1997. 647 p.
- IROBI, O.N.; YOUNG, M.; ANDERSON, W.A. Antimicrobial activity of annatto extract. **International Pharmacology**, v. 34, p. 87-90, 1996.

- JANKOWSKY, A.; GRAÇA, M. E. C. Obtenção de brotações epicórnicas de canela-sassafras (*Ocotea odorifera* (VELLOZO) RHOWER) para cultivo *in vitro*. In: CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO, 1. e CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7., 1993, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1993. p.764.
- JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002, 777 p.
- LAURO, G.J. A primer on natural colors. **Cereal Foods World**, v. 36, n. 11, p. 949-953, 1991.
- LEDERMAN, I.E.; BEZERRA, J.E.F.; ASCHOFF, M.N.A.; OLIVEIRA, E.N.M.; ROSA, J.M. Propagação vegetativa do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) e da graviola (*Annona muricata* L.) através da alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 13, n. 1, p. 55-58, 1991.
- LIMA, L.C.F. Mercado Sul-Americano do urucu. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS, 2; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE URUCUM, 1. 1991, Campinas. **Resumos...** Campinas: ITAL, p. 199-205. 1991.
- MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; GUERRA, M.P. Micropropagação de caixeta *Didymopanax morototoni* (AUBL) DCNE ET PLANCH. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 1, p. 47-61, 1999.
- MARCHIORI, J.N.C. **Dendrologia das angiospermas: das bixáceas às rosáceas**. Santa Maria: Editora UFSM, 2000, 240 p.
- MARTINS, A.B.G.; ANTUNES, E.L. Propagação do jameiro rosa (*Sizigium jambos* L. Alston.) pelo processo de alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, n. 2, p. 205-207, 2000.
- MERCADANTE, A.Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1050-1054, 1997.
- NAZARÉ, R.F.R. de; ALVES, S. de M.; BARBOSA, W.C.; RODRIGUES, I. A.; FARIA, L.J.G.; KUKUHARA, K. Estudo para identificação de vegetais produtores de corantes, ocorrentes na flora amazônica. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (Belém-PA). **Geração de tecnologia para o desenvolvimento do Trópico Úmido**. Belém: EMBRAPA-CPATU/JICA. 1996.
- NIEDZ, R.P.; BAUSHER, E.G. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse-and field-grown trees. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 38, p. 468-471, 2002.
- PAIVA NETO, V.B.; BOTELHO, M.N.; AGUIAR, R.M.; SILVA, E.A.M.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 39, n. 6, p. 629-634, 2003a.
- PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, n. 4, p. 32-38, 2003b.

PAIVA NETO, V.B.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Mannose - a potential selection system for genetic transformation of annatto (*Bixa orellana* L.). **Biologia Plantarum**, v. 47, n. 3, p. 441-444, 2003c.

PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catsetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 1002-1006, 1999.

PINHEIRO, A.L.; ALMEIDA, E.C. de. Avaliação de um híbrido artificial obtido entre duas variedades de urucum (*Bixa orellana* L.) em Viçosa – Minas Gerais. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v.1, n.1, p. 31-35, 1992.

REBOUÇAS, T.N.H.; SÃO JOSÉ, A.R. **A cultura do urucum: práticas de cultivo e comercialização**. Vitória da Conquista- BA: DFZ/UESB/SBCN, 1996. 42 p.

SÃO JOSÉ, A.R.; MASCARENHAS, J.M.O.; STRINGHETA, P.C.; REBOUÇAS, T.N.H.; OLIVEIRA, V.P. de. Cultivo del achiote (*Bixa orellana* L.) en Brasil. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v.3, p. 113-119, 1999.

SHA VALLI KHAN, P.S.; PRAKASH, E.; RAO, K.R. Callus induction and plantlet regeneration in *Bixa orellana* L., an annatto-yielding tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 38, p. 186-190, 2002.

SILVA, A.R. da. **Enraizamento de estacas de *Eucalyptus grandis* via sistema hidropônico**. Viçosa, UFV, 1998. 42p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.

SOUZA, R.C.O.S. de. *Bixa orellana* L. (Bixaceae): anatomia do eixo vegetativo. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, n. 3/4, p. 68-71, 1999.

THORPE, T.A.; HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.C., ZIMMERMAN, R.H. (Eds.). **Micropropagation: Technology and application**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p. 311-336.

TREWAVAS, A. How do plant growth substances work? **Plant, Cell and Environment**, v. 4, p. 203-228, 1981.

VIEIRA, I.M.S.; BARBOSA, A.S.A.; SERRA, A.G.P.; SILVA, S.P.G.; MOTA, M.G.C.; BOTELHO, M.N. Embriogênese somática de urucu (*Bixa orellana* L.), cultivar EMBRAPA-37. In: Congresso Brasileiro de Botânica, 51, 200, Brasília. **Proceedings ... Brasília**, 2000. p.23

WILKINSON, R.I. The adventitious rooting of vegetative cuttings using hidropropagation. In: ANNUAL MEETING OF THE INTERNATIONAL PLANT PROPAGATOR'S SOCIETY, 21. 1993, Wodonga, **Proceedings...** Victoria: The International Plant Propagator's Society, 1994. p.41-47.

CAPÍTULO III

CULTIVO *in vitro* DE *Bixa orellana* L. A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE PLANTAS ADULTAS

RESUMO

Avaliou-se a capacidade regenerativa *in vitro* de segmentos nodais de urucum (*B. orellana* L.), obtidos de brotos formados em alporques de plantas adultas, cultivados em casa de vegetação, o efeito do hipoclorito de sódio (0, 1,25, 2,5, 3,75 e 5% v/v) e do PPMTM (0, 25, 50, 75 e 100% v/v), na desinfestação superficial dos explantes, e dos antibióticos Timentin[®] (600 mg.L⁻¹), Agrimicina[®] (300 mg.L⁻¹) e do PPMTM (1% v/v), adicionados ao meio de cultura, no controle do desenvolvimento de microrganismos contaminantes *in vitro*. O meio de cultura utilizado foi o MS com vitaminas B5. Em média, 28% dos segmentos nodais apresentaram formação de brotos axilares, mesmo na presença de microrganismos contaminantes. O hipoclorito de sódio e o PPMTM, em solução, eliminaram os contaminantes fúngicos e, em concentrações mais altas, provocaram necrose e morte dos explantes. A combinação de Timentin[®], Agrimicina[®] e PPMTM no meio de cultura, controlou parcialmente o desenvolvimento de bactérias na fase de isolamento.

Palavras-chave: brotos axilares, desinfestação, hipoclorito de sódio, PPMTM,
Timentin[®], Agrimicina[®]

1 INTRODUÇÃO

O urucum, *Bixa orellana* L., é uma planta lenhosa, comercialmente conhecida por suas sementes, fonte dos pigmentos bixina e norbixina, amplamente utilizados pelas indústrias processadoras de alimentos, farmacêuticas e têxteis (LAURO, 1991; NAZARÉ et al., 1996; BOUVIER et al., 2003).

Plantas de urucum, propagadas por sementes, apresentam desuniformidade fenotípica, variações na produção de sementes e no teor de pigmentos contido nas sementes (REBOUÇAS e SÃO JOSÉ, 1996). A propagação vegetativa, através da estaquia, alporquia ou enxertia, apresenta custos elevados devido à baixa eficiência das técnicas para esta espécie (SÃO JOSÉ et al., 1999). Alternativamente, o urucum tem sido propagado mediante a indução *in vitro* de diferentes vias de expressão morfogênica (VIEIRA et al., 2000; D'SOUZA e SHARON, 2001; SHA VALLI KHAN et al., 2002; PAIVA NETO et al., 2003a, b, c; CARVALHO et al., 2005 a, b), exclusivamente em explantes juvenis.

Segmentos nodais de plantas adultas são utilizados, muitas vezes, como explantes para a propagação *in vitro* de espécies lenhosas (MANTOVANI et al., 1999, 2001; LU, 2002; NIEDZ e BAUSHER, 2002; HANDA et al., 2005), devido à facilidade na sua manipulação, por possibilitar boas taxas de respostas em algumas espécies, e manter, na maioria dos casos, a identidade genética do material propagado por reproduzirem *in vitro* um processo natural de desenvolvimento de gemas vegetativas axilares já formadas (BONGA, 1985; THORPE et al., 1991).

A redução ou perda da capacidade morfogênica dos tecidos adultos (THORPE et al., 1991) e a ocorrência de altos níveis de contaminações por microrganismos, especialmente em explantes de plantas cultivadas a campo (NIEDZ e BAUSHER, 2002), representam os maiores desafios para os protocolos de regeneração *in vitro* de espécies lenhosas a partir deste tipo de explante.

Desta forma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o comportamento de segmentos nodais, obtidos de brotos de alporques de plantas adultas, cultivados em casa de vegetação, como explantes iniciais

para a propagação *in vitro* de urucum (*B. orellana* L.). Os efeitos de substâncias antimicrobianas, na desinfestação dos explantes e controle do desenvolvimento de microrganismos contaminantes durante o cultivo *in vitro*, foram também estudados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

A fonte de material vegetal, denominada de genótipo 6 (Fruto verde piloso), foi selecionada entre 10 genótipos de *B. orellana* L., avaliados no capítulo I, por apresentar o mais alto teor de bixina. Este genótipo, com aproximadamente 12 anos de idade (Figura 1A), é cultivado no Horto da Universidade Federal de Viçosa – UFV, MG, e foi obtido a partir do cruzamento artificial entre as variedades Fruto verde piloso e Fruto vermelho liso (PINHEIRO e ALMEIDA, 1992).

Alporques foram produzidos nos ramos do genótipo 6 (Capítulo II), para serem utilizados como fontes de explantes para o cultivo *in vitro*. Os alporques (Figura 1 B) foram mantidos em casa de vegetação, sob controle fitossanitário, através de pulverizações semanais alternadas com os fungicidas Benomil (Benlate) e Captan, em solução a 0,2%, e quinzenais com o antibiótico sulfato de estreptomicina (Agrimicina[®]) a 0,1%. As regas foram feitas sempre que necessário diretamente no substrato, e mensalmente foram realizadas adubações com a formulação de adubo Ouro Verde (Takenaka S.A. Indústria e Comércio, São Paulo).

Os brotos formados nos alporques foram podados periodicamente para estimular a formação de novos brotos, mantendo, assim, um estoque de explantes para os diferentes experimentos. Destes brotos, com cerca de 10 cm de comprimento e aproximadamente 60 dias, foram excisados os segmentos nodais. Os experimentos foram realizados no período de 2004 a 2005 na Universidade Federal de Viçosa - UFV.

2.2 Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais

Brotos coletados diretamente dos alporques em casa de vegetação tiveram as folhas retiradas e foram mergulhados em solução de benomyl a 0,2%, por 30 minutos. Segmentos nodais, com cerca de 25 mm de comprimento e contendo uma gema axilar, foram excisados dos brotos e permaneceram sob água corrente por 30 minutos. Em condições assépticas,

em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais foram mergulhados em solução de álcool 70% por 1 minuto e, posteriormente, submetidos a diferentes processos de desinfestação superficial e controle do desenvolvimento de microrganismos contaminantes. Com estes objetivos, foram realizados 3 experimentos.

Experimento 1: segmentos nodais foram mergulhados por 10 minutos em solução de NaOCl (hipoclorito de sódio) a 0, 1,25, 2,5, 3,75 e 5% (v/v), lavados por 3 vezes em água destilada e autoclavada e, inoculados em meio de cultura.

Experimento 2: segmentos nodais foram mergulhados por 10 minutos em solução de NaOCl (1,25%), lavados por 3 vezes em água destilada e autoclavada, e mergulhados por 20 minutos em soluções de PPMTM (Plant Preservative Mixture) a 0, 25, 50, 75 e 100%, sendo posteriormente inoculados em meio de cultura.

Experimento 3: imersão dos segmentos nodais por 10 minutos em solução de NaOCl (1,25%), lavados por 3 vezes em água destilada e autoclavada, e em seguida mergulhados em solução de PPMTM (20%) por 20 minutos. Após este processo, os explantes foram inoculados em meio de cultura suplementado com PPMTM, Timentin[®] (ticarcilina, clavulanato de potássio) e Agrimicina[®], conforme os seguintes tratamentos: T1 - PPMTM 1%; T2 - Timentin[®] 600 mg.L⁻¹; T3 - Agrimicina[®] 300 mg.L⁻¹ e T4 - Mistura de PPMTM 1% + Timentin[®] 600 mg.L⁻¹ + Agrimicina[®] 300 mg.L⁻¹.

O NaOCl, utilizado nos 3 experimentos, foi acrescido de Tween 20 (0,1% v/v).

Aos 30 dias de cultivo, avaliou-se a frequência (%) de explantes contaminados, com necrose, livres de contaminações e viáveis. Foram considerados viáveis os segmentos nodais que desenvolveram brotos a partir das gemas axilares.

Os experimentos foram repetidos uma vez, em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento e 5 tubos por repetição, com 1 segmento nodal por tubo.

Os brotos axilares, formados nos segmentos nodais, após 30 dias de cultivo *in vitro* e, considerados viáveis, foram transferidos para meio de cultura novo, na ausência dos antibióticos e do PPM, a fim de avaliar o

desenvolvimento de bactérias em estágio subsequente ao de estabelecimento.

2.3 Meio de cultura e condições ambientais utilizadas durante o cultivo *in vitro*

Os segmentos nodais foram inoculados individualmente em tubos de ensaio de 150 mm X 25 mm, contendo alíquotas de 10 mL de meio de cultura e fechados com tampas transparentes de polipropileno. O meio utilizado foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), com complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), suplementado com 87,6 mM de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol e Phytigel[®] (Sigma Chemical Company, USA) na concentração de 2,8 g.L⁻¹. O pH do meio foi ajustado em 5,7 ± 0,1 com NaOH ou HCl 0,1 N, antes da autoclavagem por 15 minutos à temperatura de 121°C.

O PPMTM e os antibióticos Timentin[®] e Agrimicina[®] foram filtro-esterilizados e adicionados ao meio de cultura em processo de resfriamento, após a autoclavagem.

As culturas foram mantidas por um período inicial de 7 dias no escuro e, posteriormente, sob fotoperíodo de 16 horas, com intensidade luminosa aproximada de 36 µmol.m².s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil), e temperatura de 25 ± 2°C. As mesmas condições foram mantidas em todos os experimentos.

2.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através da ANOVA (análise da variância), aplicando-se regressão para as médias dos tratamentos quantitativos e o teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para a comparação das médias dos tratamentos qualitativos, utilizando-se o programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas - Universidade Federal de Viçosa).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento 1, o uso de NaOCl (hipoclorito de sódio), na desinfestação superficial dos segmentos nodais retirados de brotações de alporques de plantas adultas de urucum, foi efetivo na redução dos contaminantes fúngicos (Figura 2).

O aumento na concentração de NaOCl reduziu consideravelmente a freqüência de segmentos nodais contaminados por fungos. Com a utilização de NaOCl a 3,75%, a contaminação fúngica foi reduzida de 100% (controle) para 18% (Figura 2). A maior concentração de NaOCl (5%), não proporcionou melhores resultados de desinfestação, visto que a presença de fungos se manteve em cerca de 18% dos explantes.

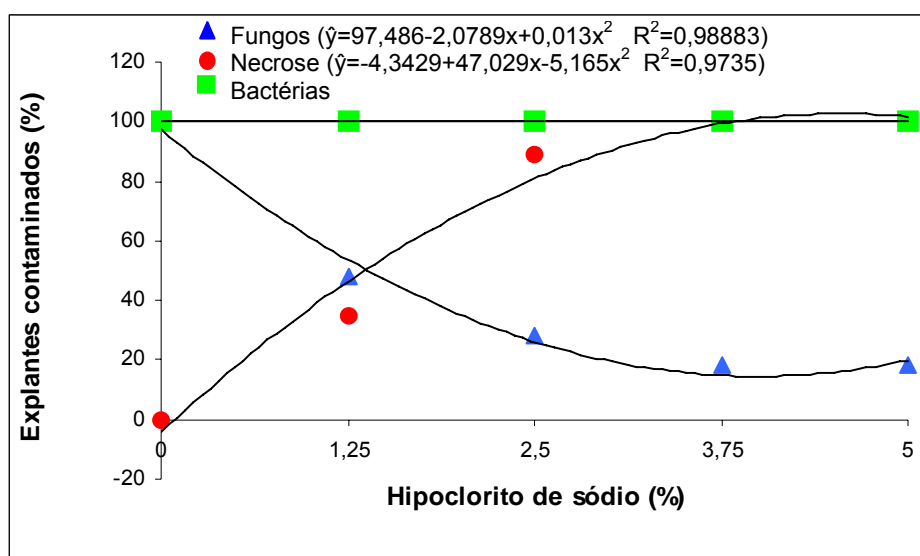


Figura 2 – Freqüência de contaminação fúngica, bacteriana e ocorrência de necrose em segmentos nodais de *B. orellana* L., tratados com solução de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações por 10 minutos, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

O desenvolvimento de fungos ocorreu, geralmente, na axila foliar dos segmentos nodais (Figura 1C), região onde provavelmente os agentes desinfestantes tiveram menor contato com os tecidos. O desenvolvimento destes microrganismos, todavia, não impediu o crescimento inicial dos brotos em alguns explantes.

Por sua vez, o aumento na concentração de NaOCl provocou escurecimento, necrose e morte das gemas axilares e dos segmentos

nodais. Nas concentrações de 3,75% e 5% de NaOCl, 100% dos explantes apresentaram necrose severa (Figura 2), impossibilitando o desenvolvimento das gemas axilares e o aproveitamento de brotos em fases posteriores do cultivo *in vitro*. Comportamento semelhante foi observado em segmentos nodais de caixeta, em que o aumento na concentração de NaOCl, ou no tempo de exposição dos explantes a esta substância, foram responsáveis pelo aumento da frequência de necrose e morte de explantes (MANTOVANI et al., 1999)

O uso de hipoclorito de sódio, ou de cálcio, é comum em processos de desinfestação superficial de explantes de inúmeras espécies. A eficiência germicida destas substâncias, segundo Niedz e Bausher (2002), se deve principalmente ao ácido hipocloroso (HOCl), que tem sua concentração aumentada à medida que a solução de hipoclorito é acidificada. O NaOCl foi efetivo no controle de contaminações fúngicas de explantes de mirtilo (ERIG et al., 2003) e de fisalis (CHAVES et al., 2005), proporcionando melhores resultados de desinfestação quando comparado ao hipoclorito de cálcio.

Os resultados deste experimento indicam que a concentração de 1,25% de NaOCl é a mais indicada para a desinfestação dos segmentos nodais de urucum, por possibilitar bom nível de descontaminação fúngica e sobrevivência dos explantes.

O NaOCl, no entanto, nas concentrações utilizadas, não foi efetivo para a eliminação ou controle do desenvolvimento de bactérias nos segmentos nodais de urucum. Após 30 dias de cultivo *in vitro*, 100% dos explantes apresentaram contaminação bacteriana, independentemente da concentração de NaOCl (Figura 2). O desenvolvimento das bactérias ocorreu tanto na base dos explantes, em contato com o meio de cultura (Figura 1D), como na região axilar (Figura 1E). Em alguns explantes, a presença das bactérias não impediu o desenvolvimento das gemas axilares e a formação dos brotos.

Embora o NaOCl seja um dos agentes esterilizantes mais comuns utilizados na cultura de tecidos (NIEDZ e BAUSHER, 2002), sua ação germicida se dá de forma mais efetiva no controle de microrganismos contaminantes que se encontram na superfície dos tecidos. O desenvolvimento de bactérias, geralmente de natureza endofítica, é de

controle mais difícil e, nesse caso, o hipoclorito em solução, mesmo em altas concentrações, não se torna eficiente.

Os efeitos do PPMTM no processo de desinfestação superficial dos segmentos nodais de urucum (experimento 2), foram semelhantes aos observados com o NaOCl. A imersão dos segmentos nodais, por 20 minutos, em soluções de PPMTM, proporcionou redução na contaminação fúngica, sendo que nas concentrações acima de 25% estes microrganismos não se desenvolveram (Figura 3).

O aumento na concentração do PPMTM também promoveu aumento na freqüência de explantes apresentando necrose. Em concentrações acima de 25%, a freqüência de necrose aumentou drasticamente (Figura 3).

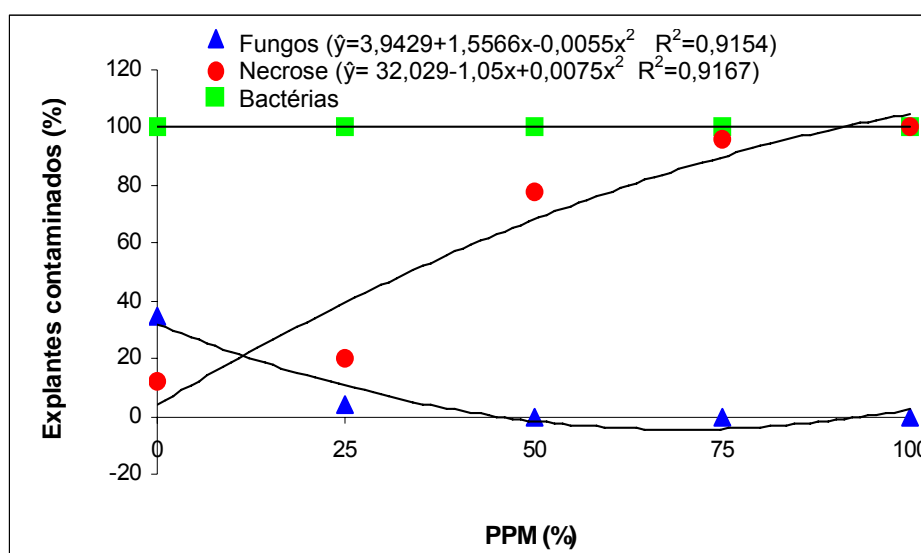


Figura 3 – Freqüência de contaminação fúngica, bacteriana e ocorrência de necrose em segmentos nodais de *B. orellana* L., tratados com solução de hipoclorito de sódio (1,25% v/v), por 10 minutos, e solução de PPMTM em diferentes concentrações, por 20 minutos, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

O PPMTM contém uma mistura de duas isothiazolonas (metil-cloro-isotiazolinona e metil-isotiazolinona), que pertencem a uma classe de biocidas industriais utilizados profilaticamente no meio de cultura para controlar a contaminação microbiana em tecidos vegetais (NIEDZ, 1998; NIEDZ e BAUSHER, 2002). Segundo Niedz (1998), quando adicionado ao meio de cultura, mesmo em concentração duas vezes mais alta que a recomendada pelo fabricante (2%), o PPMTM apresenta baixa fitotoxicidade.

No entanto, em solução, altas concentrações de PPMTM e longo período de contato com o tecido vegetal, provocaram necrose e morte de segmentos nodais de plantas de *Citrus* (NIEDZ e BAUSHER, 2002).

O PPMTM, nas condições em que foi utilizado neste experimento, não foi efetivo na eliminação de bactérias de segmentos nodais de urucum, visto que 100% dos explantes apresentaram contaminação por este tipo de microrganismo (Figura 3). No entanto, apesar de presentes, o desenvolvimento das bactérias foi mais lento nos explantes tratados com solução de PPMTM, quando comparado com o desenvolvimento das bactérias nos segmentos nodais do controle.

O desenvolvimento de certos fungos, bactérias e leveduras, que encontram nas condições *in vitro* um ambiente favorável para sua multiplicação, pode inibir o crescimento das culturas pela concorrência por nutrientes e produção de compostos, que modificam a composição do meio nutritivo e se tornam tóxicos (LEIFERT et al., 1991).

Tendo em vista que a contaminação bacteriana persistiu nos explantes de urucum, mesmo depois de serem submetidos aos diferentes processos de desinfestação, optou-se pela utilização de diferentes substâncias com ação antimicrobiana, como o PPMTM e os antibióticos Timentin[®] e Agrimicina[®], incorporadas ao meio nutritivo para o cultivo dos segmentos nodais (experimento 3).

Isoladamente, o PPMTM, o Timentin[®] ou a Agrimicina[®], nas concentrações em que foram adicionados ao meio de cultura, apresentaram baixa eficiência no controle bacteriano dos explantes, contudo, a utilização simultânea das três substâncias proporcionou efeitos positivos no controle dos contaminantes. Aos 30 dias de cultivo, a combinação das substâncias resultou em 28% dos segmentos nodais de urucum livres de contaminação visível, com desenvolvimento de gemas axilares e formação de brotos (Tabela 1).

Não foram observados sintomas de fitotoxicidade provocados pelo uso do PPMTM e dos antibióticos Timentin[®] e Agrimicina[®], isoladamente ou em combinação, visto que todos os explantes considerados livres de contaminação visível foram considerados viáveis por apresentarem respostas regenerativas (Tabela 1). Segundo Leifert et al (1991) e Reed et

al. (1998), a combinação de antibióticos no meio de cultura se torna mais efetiva no controle de microrganismos contaminantes dos tecidos vegetais, quando comparada aos efeitos individuais destes antibióticos.

Tabela 1 – Influência de diferentes substâncias com ação antimicrobiana, adicionadas ao meio de cultura MS, sobre a freqüência de segmentos nodais de *Bixa orellana* L. livres de contaminantes e viáveis, aos 30 dias de cultura *in vitro*

Tratamentos	Freqüência (%) de segmentos nodais livres de contaminantes e viáveis*
PPM TM 1%	4,0 ± 8,9 b
Timentin [®] 600 mg.L ⁻¹	8,0 ± 10,9 b
Agrimicina [®] 300 mg.L ⁻¹	4,0 ± 8,9 b
PPM TM 1% +Timentin [®] 600 mg.L ⁻¹ + Agrimicina [®] 300 mg.L ⁻¹	28,0 ± 10,9 a

Médias ± desvio padrão de 5 repetições de 5 explantes por parcela.

Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

*Foram considerados viáveis os segmentos nodais que desenvolveram brotos a partir das gemas axilares.

Quanto à fitotoxicidade dos antibióticos, Reed et al. (1998) consideraram ser baixa para Timentin[®], gentamicina e estreptomicina, quando adicionados simultaneamente ao meio de cultivo. Picoli et al. (2005) verificaram que concentrações de até 600 mg.L⁻¹ de Timentin[®] e carbenicilina não prejudicaram o processo morfogênico em explantes de eucalipto.

Os explantes de urucum, provenientes de alporque de plantas adultas, utilizados neste trabalho, apresentaram elevada capacidade regenerativa *in vitro*. Todos os segmentos nodais, considerados livres de contaminação e viáveis, apresentaram gemas axilares intumescidas, que se desenvolveram formando brotos (Figura 1F). Mesmo alguns, visivelmente contaminados por fungos ou bactérias, apresentaram desenvolvimento de brotos a partir das gemas axilares (Figura 1C, 1D e 1E). Esta capacidade regenerativa pode ter sido favorecida pelo rejuvenescimento, ou revigoramento dos brotos formados nos alporques, em função das podas sucessivas e adubações periódicas, que proporcionaram boas condições fisiológicas à planta matriz e, conseqüentemente, aos explantes.

A manutenção dos alporques fornecedores de explantes em ambiente de casa de vegetação, com adoção de práticas culturais, tratamentos fitossanitários e nutricionais de forma controlada, pode ser considerada indispensável para a obtenção de material vegetal em condições que possibilitem a expressão da potencialidade morfogênica dos segmentos nodais, quando cultivados *in vitro*. Técnicas para o rejuvenescimento, ou reversão de fase, têm sido utilizadas com sucesso para aumentar ou induzir a competência de tecidos adultos de espécies lenhosas e, explorá-la em processos regenerativos *in vitro* (ASSIS e TEIXEIRA, 1998; MANTOVANI et al., 1999; ALFENAS et al., 2004).

Os brotos formados a partir do desenvolvimento das gemas axilares nos segmentos nodais de urucum, após 30 dias de cultivo no meio de estabelecimento, embora visivelmente isentos de contaminantes, quando transferidos para novo meio de cultura na ausência dos antibióticos ou do PPMTM, passaram a apresentar contaminação bacteriana. Estes resultados demonstram que os processos de desinfestação dos segmentos nodais e de controle do desenvolvimento *in vitro* dos contaminantes, não foram totalmente efetivos para a eliminação de bactérias. As substâncias utilizadas para este fim, apresentaram ação bacteriostática, e não propriamente bactericida, permitindo o desenvolvimento das bactérias no estágio posterior ao de isolamento dos segmentos nodais. Resultados semelhantes foram verificados por Picoli et al. (2005), Kobayashi e Palumbo (2000) e Niedz e Bausher (2002), que atribuíram este fato à ausência de sintomas macroscópicos nos explantes na fase de isolamento, ou à estágios latentes dos organismos endofíticos dos explantes.

Apesar da contaminação bacteriana, os segmentos nodais de urucum, obtidos de alporques, apresentam alta capacidade regenerativa e potencialidade para serem utilizados no cultivo *in vitro* desta espécie. Futuros estudos para o isolamento e identificação das bactérias presentes nos tecidos, poderão orientar o uso de antibióticos específicos e dosagens apropriadas nas diferentes fases do cultivo, de forma a eliminar ou controlar o desenvolvimento destes microrganismos *in vitro*.



Figura 1 – Formação e cultivo *in vitro* de segmentos nodais de alporques de plantas adultas de urucum (*Bixa orellana* L.). A – Genótipo 6 (seta); B - Alporque do genótipo 6 cultivado em casa de vegetação e fonte de brotos; C - Desenvolvimento de bactéria no meio de cultura (seta), com origem no explante; D – Segmento nodal com desenvolvimento de fungo na axila foliar (seta); E – Desenvolvimento de bactéria na axila foliar (seta); F - Desenvolvimento de broto axilar, com 20 dias de cultivo.

4 CONCLUSÕES

Alporques de plantas adultas, mantidos em casa de vegetação, sob condições fitossanitárias e nutricionais controladas, podem ser utilizados como fontes de segmentos nodais para o cultivo *in vitro* de urucum. Estes explantes apresentam elevada capacidade regenerativa *in vitro*, mesmo na presença de microrganismos contaminantes.

O processo de imersão dos explantes em soluções de hipoclorito de sódio a 1,25%, por 10 minutos e PPMTM a 20%, por 20 minutos, é eficiente na eliminação de contaminantes fúngicos.

A combinação de PPMTM 1% + Timentin[®] 600 mg.L⁻¹ + Agrimicina[®] 300 mg.L⁻¹ no meio de cultura de isolamento controla parcialmente o desenvolvimento de bactérias nos explantes.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 422 p.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ. v 1, 1998. p.261-296.
- BONGA, J.M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Eds.) **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p.4-35.
- BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CÂMARA, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, v. 300, p.2089-2091, 2003.
- CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, n. 1, p. 69-75, 2005a.
- CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, v. 29: 887-895, 2005b.
- CHAVES, A.da C.; SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, 2005.
- D'SOUZA, M.C.; SHARON, M. *In vitro* clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 37, p. 168-172, 2001.
- ERIG, A.C.; VICENZI, M.; CHAVES, A.C.; SCHUCH, M.W.; FACHINELLO, J.C. Desinfestação de explantes de Mirtilo (*Vaccinium aschei* Reade) visando o estabelecimento de plantas *in vitro*. **Revista Científica Rural**, v. 8, n. 1, p. 142-148, 2003.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.
- HANDA, L.; SAMPAIO, P. de T. B.; QUISEN, R.C. Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, v. 35, n. 1, p. 29-33, 2005.
- KOBAYASHI, D. Y.; PALUMBO, J. D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: BACON, C. W.; WHITE Jr, J. F. **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker, Inc. 2000. p. 199-233.
- LAURO, G.J. A primer on natural colors. **Cereal Foods World**, v. 36, n. 11, p. 949-953, 1991.
- LEIFERT, C.; RITCHIE, J.Y., WAITES, W.M. Contaminants of plant tissue and cell cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 452-469, 1991.

- LU, M.C. Micropropagation of *Morus latifolia* Poilet using axillary buds from mature trees. **Scientia Horticulturae**, v. 96, p. 329-341, 2002.
- MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; GUERRA, M.P. Micropropagação de caixeta *Didymopanax morototoni* (AUBL) DCNE ET PLANCH. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 1, p. 47-61, 1999.
- MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de Louro-Pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, v.11, n. 2, p. 93-101, 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAZARÉ, R.F.R. de; ALVES, S. de M.; BARBOSA, W.C.; RODRIGUES, I. A.; FARIA, L.J.G.; KUKUHARA, K. Estudo para identificação de vegetais produtores de corantes, ocorrentes na flora amazônica. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (Belém-PA). **Geração de tecnologia para o desenvolvimento do Trópico Úmido**. Belém: EMBRAPA-CPATU/JICA, 1996.
- NIEDZ, R.P. Isothiasolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. **Hort Technology**, v. 8, p. 598-601, 1998.
- NIEDZ, R.P.; BAUSHER, E.G. Control of in vitro contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, v. 38, p. 468-471, 2002.
- PAIVA NETO, V.B.; BOTELHO, M.N.; AGUIAR, R.M.; SILVA, E.A.M.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 39, n. 6, p. 629-634, 2003a.
- PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.,R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, n. 4, p. 32-38, 2003b.
- PAIVA NETO, V.B.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Mannose - a potential selection system for genetic transformation of annatto (*Bixa orellana* L.). **Biologia Plantarum**, v. 47, n. 3, p. 441-444, 2003c.
- PINHEIRO, A.L.; ALMEIDA, E.C. de. Avaliação de um híbrido artificial obtido entre duas variedades de urucum (*Bixa orellana* L.) em Viçosa – Minas Gerais. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, n. 1, p. 31-35, 1992.
- PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; DIAS, L. L. C.; NEVES, D. A.; OTONI, W. C. *In vitro* morphogenesis of *Eucalyptus grandis*: effects of antibiotic and explant sources. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 234-240, 2005.
- REBOUÇAS, T.N.H.; SÃO JOSÉ, A.R. **A cultura do urucum: práticas de cultivo e comercialização**. Vitória da Conquista- BA: DFZ/UESB/SBCN, 1996. 42 p.

REED, B. M.; MENTZER, J.; TANSPRASERT, P.; YU, X. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 52, p. 67-70, 1998.

SÃO JOSÉ, A.R.; MASCARENHAS, J.M.O.; STRINGHETA, P.C.; REBOUÇAS, T.N.H.; OLIVEIRA, V.P. de. Cultivo del achiote (*Bixa orellana* L.) en Brasil. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 3, p. 113-119, 1999.

SHA VALLI KHAN, P.S.; PRAKASH, E.; RAO, K.R. Callus induction and plantlet regeneration in *Bixa orellana* L., an annatto-yielding tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 38, p. 186-190, 2002.

THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C., ZIMMERMAN, R. H. (Eds.). **Micropropagation: Technology and application**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p. 311-336.

VIEIRA, I.M.S.; BARBOSA, A.S.A.; SERRA, A.G.P.; SILVA, S.P.G.; MOTA, M.G.C.; BOTELHO, M.N. Embriogênese somática de urucu (*Bixa orellana* L.), cultivar EMBRAPA-37. In: Congresso Brasileiro de Botânica, 51, 200, Brasília. **Proceedings ... Brasília**, 2000. p.23

CAPÍTULO IV

REGENERAÇÃO *in vitro* EM EXPLANTES JUVENIS DE *Bixa orellana* L.

RESUMO

Este trabalho descreve um sistema de regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.), através da diferenciação direta de brotos adventícios em explantes juvenis. Avaliou-se a capacidade regenerativa de discos cotiledonares, segmentos hipocotiledonares e radiculares, cultivados em meio de cultura MS e WPM, acrescidos citocininas, e o enraizamento de brotos adventícios na presença de AIB. A ZEA induziu aumento significativo na frequência organogênica. No meio WPM, com 4,56 µM de ZEA, a regeneração de brotos ocorreu em 86,2% dos segmentos hipocotiledonares, em 40% dos discos cotiledonares e em 31,2% dos segmentos radiculares. A capacidade de segmentos hipocotiledonares e radiculares em regenerar brotos variou conforme a posição no órgão de origem, estabelecendo um gradiente de potencial morfogênico que cresce do ápice em direção à base dos hipocótilos e raízes. A comparação da atividade de diferentes citocininas, a 4,56 µM, mostrou que as mais altas frequências organogênicas, em segmentos hipocotiledonares, foram induzidas com o TDZ (85%) e com a ZEA (80%), quando comparadas com o BAP (62%) e o 2iP (46%). A ZEA proporcionou melhor desenvolvimento dos brotos e o TDZ induziu maior frequência de hiperidrificação. O AIB, a 4,9 µM, proporcionou a maior frequência de enraizamento de brotos (25%) e número de raízes por broto (2). As plantas enraizadas foram transferidas para substrato e aclimatizadas com sucesso em casa de vegetação. Análises histológicas comprovaram a origem adventícia dos brotos, a partir da organização direta de centros meristemáticos em regiões externas do córtex dos segmentos de hipocótilo.

Palavras-chave: organogênese direta, meio de cultura, reguladores de crescimento, histologia.

1 INTRODUÇÃO

Os pigmentos carotenóides bixina e norbixina, produzidos exclusivamente pelo urucum (*Bixa orellana* L.), são empregados pelas indústrias no processamento de alimentos, na produção de cosméticos e medicamentos (LAURO, 1991; BOUVIER et al., 2003). As vantagens da utilização destes pigmentos são atribuídas às propriedades dos carotenóides, relacionadas à conversão em vitamina A, às atividades antioxidantes (KIOKIAS e GORDON, 2003; AGNER et al., 2004), e antimicrobianas (FLEISCHER et al., 2003).

Em urucum, estes carotenóides são sintetizados na testa das sementes e são depositados na sua superfície externa (JAKO et al., 2002). Diferentes aspectos da seqüência de reações que constituem a rota de biossíntese dos carotenóides já foram elucidados (CUNNINGHAM e GRANTT, 1998; BOUVIER et al., 2003) e têm estimulado o interesse na manipulação do conteúdo e composição destes compostos em urucum (PAIVA NETO et al., 2003a; ZALDÍVAR-CRUZ et al., 2003). Esta manipulação pode ser realizada via engenharia genética, a qual envolve a transformação de células e posterior regeneração de plantas mediante técnicas de cultura de células, tecidos e órgãos *in vitro*.

A habilidade dos tecidos somáticos de responder aos estímulos fornecidos durante o cultivo *in vitro* é um pré-requisito para a indução e expressão da morfogênese. Neste aspecto, a regeneração de brotos adventícios, a partir de diferentes tipos de explantes juvenis, tem sido o sistema mais utilizado para a obtenção de plantas transgênicas (NAGORI e PUROHIT, 2004), bem como para a propagação clonal de genótipos selecionados de certas espécies lenhosas.

Plântulas obtidas a partir da germinação de sementes *in vitro* e embriões zigóticos, são amplamente utilizados como fontes de explantes para a indução de diferentes vias de expressão morfogênica em inúmeras espécies. A utilização destes tipos de explantes se deve à facilidade com que as sementes são descontaminadas, à facilidade de obtenção de grande número de explantes homogêneos, livres de contaminantes e, geralmente, com alta capacidade regenerativa *in vitro*. A maior proporção de tecidos

meristemáticos confere, a certos explantes juvenis, maior capacidade regenerativa, quando comparada à explantes adultos (BHOJWANI e RAZDAN, 1983).

Explantes juvenis, obtidos de plântulas germinadas *in vitro*, como os hipocotiledonares (CARVALHO, 2000; PAIVA NETO et al., 2003a, b; ZALDÍVAR-CRUZ et al., 2003; CARVALHO et al., 2005 a, b), ápices caulinares e segmentos nodais (D'SOUZA e SHARON, 2001), têm sido utilizados para a indução de brotos adventícios em urucum.

A definição do meio de cultura, tipo e concentração de reguladores de crescimento, e o tipo de explante, são fundamentais para o sucesso da regeneração *in vitro*, visto que estes diferentes fatores interferem na indução e expressão dos processos morfogênicos. Desta forma, este trabalho teve como objetivos avaliar o comportamento de diferentes tipos de explantes juvenis, os efeitos dos meios de cultura, do tipo e da concentração de reguladores de crescimento, a fim de determinar as melhores condições para a regeneração *in vitro* de plantas de urucum (*Bixa orellana* L.), através da diferenciação direta de brotos adventícios.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Frutos maduros foram coletados de uma planta denominada de genótipo 6 (Fruto verde piloso), selecionada entre 10 genótipos de *B. orellana* L. (Capítulo I), por apresentar o mais alto teor de bixina nas sementes. Esta planta, com aproximadamente 12 anos de idade, cultivada no Horto da Universidade Federal de Viçosa – UFV, MG, foi obtida a partir do cruzamento artificial entre as variedades Fruto verde piloso e Fruto vermelho liso (PINHEIRO e ALMEIDA, 1992). Os experimentos foram realizados no período de 2003 a 2005 na Universidade Federal de Viçosa – UFV.

2.2 Germinação de sementes *in vitro* e obtenção de explantes

As sementes foram desinfestadas com soluções de etanol 70 % (v/v), por 1 minuto, água sanitária 50% (v/v, com 2,5% de cloro ativo), acrescida de Tween 20 a 0,1% (v/v), por 20 minutos, e depois enxaguadas por 3 vezes em água destilada e autoclavada. As sementes foram escarificadas com o auxílio de bisturi, na posição oposta ao embrião, e colocadas para germinar em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e WPM (Woody Plant Medium) (LLOYD e McCOWN, 1980).

Plântulas com 30 dias de idade foram utilizadas como fontes de explantes para os diferentes experimentos, descritos a seguir.

2.3 Potencial morfogênico de cotilédones, hipocótilos e raízes

Discos cotiledonares (8 mm de diâmetro), segmentos hipocotiledonares e radiculares (10 mm de comprimento), obtidos de plântulas desenvolvidas nos meios MS e WPM, foram cultivados nos mesmos meios de cultura adicionados ou não de 4,56 µM de ZEA (Zeatina), em placas de Petri de poliestireno (150 mm X 15 mm).

Aos 30 dias de cultivo, avaliou-se a freqüência de explantes com formação de brotos adventícios e calos.

O experimento foi repetido uma vez, em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições (placas de Petri) por tratamento e 16 explantes por placa.

2.4 Potencial morfogênico de explantes ao longo do eixo hipocotiledonar e radicular

Foram realizados dois experimentos independentes para avaliar o potencial morfogênico de segmentos (10 mm de comprimento), obtidos das posições apical, mediana e basal, ao longo do eixo hipocotiledonar (experimento 1) e ao longo do eixo radicular (experimento 2), de plântulas desenvolvidas *in vitro* em meio de cultura WPM. Os explantes foram cultivados horizontalmente, no meio de cultura WPM com 4,56 µM de ZEA, em placas de Petri de poliestireno (90 mm X 15 mm).

Aos 30 dias de cultivo avaliou-se a freqüência de explantes com formação de brotos adventícios.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições (placas de Petri) por tratamento e 8 explantes por placa.

2.5 Efeito de diferentes citocininas na indução de brotos adventícios em explantes hipocotiledonares

Segmentos de hipocótilo (10 mm de comprimento), obtidos da posição basal do eixo hipocotiledonar de plântulas desenvolvidas *in vitro* em meio WPM, foram cultivados no mesmo meio de cultura, adicionado ou não de 4,56 µM das citocininas, ZEA, BAP (6-benzilaminopurina), TDZ (thidiazuron) e 2iP (isopenteniladenina). Os explantes foram inoculados horizontalmente no meio de cultura, em frascos de vidro (240 mL).

Aos 30 dias de cultivo avaliou-se a influência das citocininas sobre a frequência de explantes com formação de brotos adventícios, com brotos alongados (comprimento superior a 10 mm) e hiperidrificadas.

O experimento foi repetido uma vez, em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições (frascos de cultura) por tratamento e 6 explantes por frasco.

2.6 Enraizamento de brotos adventícios

Brotos adventícios, com comprimento superior a 15 mm, formados em segmentos basais de hipocótilo em meio WPM suplementado com 4,56 μM de ZEA, foram cultivados em frascos de vidro de 240 mL contendo o meio de cultura WPM, adicionado de 0, 2,45, 4,90, 7,35 e 9,80 μM de AIB (ácido indol-3-butírico).

Avaliou-se, após 30 dias de cultivo, a frequência de explantes enraizados e o número de raízes formadas em cada explante.

O experimento foi repetido uma vez, em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições (frascos de cultura) por tratamento e 3 explantes por frasco.

Plantas enraizadas foram retiradas dos frascos, lavadas com água destilada, plantadas em recipientes contendo vermiculita, aclimatizadas e cultivadas em casa de vegetação.

2.7 Meios de cultura e condições ambientais utilizadas durante o cultivo *in vitro*

Os meios de cultura, MS e WPM, foram suplementados com 100 mg.L^{-1} de mio-inositol, 2,8 g.L^{-1} de Phytigel[®] (Sigma Chemical Company, USA), e 87,6 mM de sacarose (58,4 mM para o experimento de enraizamento). Para o meio MS, utilizou-se o complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968).

O pH dos meios de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, com NaOH ou HCl 0,1 N, após a adição dos reguladores de crescimento e antes da autoclavagem à temperatura de 121°C e 0,122 Mpa, por 15 minutos.

Os meios de cultura foram vertidos em placas de Petri de poliestireno descartáveis de 90 mm X 15 mm e 150 mm X 15 mm, em alíquotas de 25 mL e 50 mL, respectivamente e, em tubos de ensaio de 150 mm X 25 mm e frascos de cultura de 240 mL, em alíquotas de 10 mL e 50 mL, respectivamente. As placas de Petri foram vedadas com filme de PVC, após o resfriamento completo do meio autoclavado. Os tubos de ensaio e os frascos de cultura foram fechados com tampas transparentes de polipropileno, antes da autoclavagem dos mesmos.

As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa aproximada de $36 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil), e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.8 Avaliações histológicas

Segmentos de hipocótilo cultivados em meio de cultura WPM, suplementado com $4,56 \mu\text{M}$ de ZEA, foram fixados em solução de Glutaraldeído 2% (em solução tampão fosfato de sódio de Sorenson), desidratados em série etílica, infiltrados e emblocados em historesina (Glicol Metacrilato), e seccionados transversalmente com espessura de $8 \mu\text{m}$ em micrótomo automático (LEICA RM 2155).

Os cortes histológicos foram corados com Azul de Toluidina a pH 4,0, e posteriormente montados em lâminas permanentes com bálsamo do Canadá. As observações e a aquisição das imagens foram realizadas em microscópio de luz (Olympus AX70), com sistema U-Photo.

2.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através da ANOVA (análise da variância), aplicando-se regressão para as médias dos tratamentos quantitativos e o teste de Tukey a 5% de probabilidade, para a comparação das médias dos tratamentos qualitativos, utilizando-se o programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas - Universidade Federal de Viçosa).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Potencial morfogênico de cotilédones, hipocótilos e raízes

O potencial morfogênico de explantes juvenis de urucum, representado pela freqüência de explantes com formação de brotos adventícios *in vitro*, foi influenciado pelo órgão de origem, pela presença de citocinina e pelo tipo de meio de cultura utilizado.

Comparando os diferentes órgãos, os hipocótilos apresentaram maiores freqüências de resposta, seguidos dos cotilédones e das raízes das plântulas, quando cultivados nos meios de cultura MS e WPM suplementados com 4,56 µM de ZEA (Tabela 1). Sem a adição de ZEA, no entanto, os explantes não diferiram entre si quanto ao potencial morfogênico.

A velocidade de resposta também foi maior em segmentos de hipocótilo, quando comparada com os demais explantes. Os brotos adventícios se tornaram visíveis aos 10 dias de cultivo, em alguns segmentos de hipocótilo, e aos 20 dias, em discos cotiledonares e segmentos radiculares.

Tabela 1 – Influência do meio de cultura e da ZEA (4,56 µM) sobre a freqüência (%) de explantes juvenis de *Bixa orellana* L., com formação de brotos adventícios e calos, aos 30 dias de cultivo *in vitro*

Meios de Cultura	Freqüência Organogênica (%)*			Freqüência Calogênica (%)*
	Explante			
	Cotiledonar	Hipocotiledonar	Radicular	
MS	A 6,2 ± 0,0 b	A 7,5 ± 2,8 c	A 6,2 ± 0,0 b	6,2 ± 0,0 c
WPM	A 8,7 ± 3,4 b	A 11,2 ± 2,8 c	A 6,2 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 c
MS + ZEA	B 32,5 ± 2,8 a	A 67,5 ± 5,2 b	C 23,7 ± 5,2 a	54,5 ± 6,5 a
WPM + ZEA	B 40,0 ± 3,4 a	A 86,2 ± 5,2 a	C 31,2 ± 4,4 a	19,1 ± 8,5 b

Médias ± desvio padrão de 5 repetições de 16 explantes.

Médias precedidas da mesma letra na linha, e seguidas da mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

*Dados transformados em arc sen [raiz (x/100)].

Segmentos de hipocótilos têm sido utilizados para a regeneração *in vitro* de espécies lenhosas como *Psidium guajava* (SINGH et al., 2002), *Annona squamosa* (NAGORI e PUROHIT, 2004) e *Bixa orellana*

(CARVALHO, 2000; PAIVA NETO et al., 2003a, b; ZALDÍVAR-CRUZ et al., 2003; CARVALHO et al., 2005a, b), em função da praticidade de obtenção, disponibilidade em grandes quantidades, e altas taxas de respostas que apresentam *in vitro*. Este tipo de explante apresenta maior proporção de tecidos meristemáticos, quando comparado a explantes adultos, o que confere aos explantes juvenis, maior capacidade regenerativa *in vitro* (BHOJWANI e RAZDAN, 1983).

Discos cotiledonares de urucum, cultivados com citocinina, apresentaram maiores freqüências de resposta, quando comparados aos segmentos radiculares (Tabela 1). A formação de brotos adventícios ocorreu em 40% dos discos cotiledonares em meio WPM, e em 32,5% em meio MS. Paiva Neto et al. (2003a), no entanto, não observaram respostas organogênicas em discos cotiledonares, quando cultivados em meio MS suplementado com ZEA, BAP ou TDZ. Os diferentes resultados encontrados podem ser atribuídos aos diferentes genótipos utilizados nos estudos.

Segmentos radiculares formaram brotos adventícios, nos dois meios de cultura, mesmo na ausência de citocinina (Tabela 1). Os resultados observados demonstram a capacidade regenerativa *in vitro* de raízes de plântulas de urucum, e a potencialidade dos explantes radiculares para serem utilizados na propagação clonal e também para manipulações genéticas nesta espécie. Diferentes fatores interferem na capacidade regenerativa de explantes radiculares. O metabolismo hormonal influenciou na capacidade regenerativa de explantes radiculares de diferentes genótipos de orquídeas (PERES e KERBAUY, 1999). O genótipo foi determinante na natureza da regeneração, direta ou indireta de brotos, em explantes radiculares de tomateiro (PERES et al., 2001), e a dependência de uma fonte exógena de citocinina, na formação de brotos adventícios em segmentos radiculares de caqui foi observada por Carvalho e Biasi (2004).

A ZEA induziu aumento significativo na freqüência de explantes hipocotiledonares, cotiledonares e radiculares de urucum, com formação de brotos adventícios nos dois meios de cultura testados (Tabela 1). Este aumento na freqüência de resposta dos explantes a ZEA demonstra a necessidade de uma fonte exógena de citocinina para obtenção de altas

taxas de indução e formação de brotos adventícios nos explantes juvenis de urucum. Como verificado na tabela 1, a intensidade de resposta induzida pela ZEA foi significativamente maior nos segmentos de hipocótilo cultivados no meio WPM (86,2%), comparativamente à resposta observada no meio MS (67,5%). Isto evidencia que um determinado regulador de crescimento pode induzir diferentes intensidades de resposta, em um mesmo tipo de explante, variando a constituição do meio de cultura. A interação entre estes fatores influenciou a morfogênese de explantes de urucum neste trabalho.

Os componentes do meio de cultura afetam de diferentes formas e intensidades os processos morfogênicos de explantes (RAMAGE e WILLIAMS, 2002; NAS e READ, 2004) e podem, através de interações com os reguladores de crescimento, afetar de forma decisiva a expressão destes padrões *in vitro* (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Em alguns casos, a combinação precisa entre o meio de cultura e o estágio fisiológico do explante pode, até mesmo, eliminar a necessidade de suplementação de substâncias reguladoras de crescimento, como na indução de culturas poliembriogênicas de *Araucaria angustifolia*, a partir de explantes de pró-embriões zigóticos cultivados em meio LP (GUERRA et al., 1999).

Machado et al. (2007) compararam cinco meios de cultura para a indução de brotos em porta-enxertos de videira, constatando que o meio de cultura WPM induziu menor número de brotos por explante, quando comparado aos meios MS ½, QL, C2D e NN. Nas e Read (2004) desenvolveram um meio para o cultivo *in vitro* de avelã, baseado na constituição de minerais e vitaminas encontradas em extratos das sementes, e compararam com outros meios. O meio desenvolvido para a espécie foi considerado o melhor, seguido do WPM, sendo que o MS foi inapropriado para esta espécie, demonstrando que a adequação dos constituintes do meio, em função das necessidades específicas da espécie e, ou, genótipo cultivado, é de fundamental importância para o sucesso da regeneração *in vitro*.

Os trabalhos relacionados com o cultivo *in vitro* de urucum, citados na literatura, utilizaram o MS como meio de cultura básico. Neste trabalho, os meios MS e WPM induziram respostas semelhantes nos diferentes explantes, sendo o WPM estatisticamente superior ao MS, na indução de

brotos adventícios apenas no cultivo de segmentos de hipocótilo, e na presença de ZEA.

A formação de calos foi observada nos três tipos de explantes de urucum. A ZEA intensificou a frequência calogênica, e seu efeito foi potencializado no meio MS, provavelmente em função de interações com as altas concentrações salinas deste meio. A formação de calos foi observada em 54,5% dos explantes cultivados no meio MS, e em 19,1% dos explantes no meio WPM (Tabela 1). A ZEA, na concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, ou seja, metade da concentração utilizada neste trabalho, também induziu a formação de calos em segmentos de hipocótilo de urucum, quando cultivados em meio MS (CARVALHO, 2000; CARVALHO et al., 2005b).

Proliferações celulares foram observadas, inicialmente, na região terminal das nervuras, nas margens dos discos cotiledonares e nas extremidades cortadas dos segmentos hipocotiledonares e radiculares, progredindo e formando pequenos agregados celulares branco-amarelados de aspecto friável, restritos às regiões lesionadas dos explantes. Os calos ocorreram de forma isolada, concomitantemente ou depois do surgimento das gemas adventícias, e não impediram o desenvolvimento dos brotos. A formação de calos resulta do processo de desdiferenciação das células dos tecidos do explante, e progride, através de divisões celulares induzidas, basicamente pela presença de reguladores de crescimento no meio de cultura. A própria constituição química do meio de cultura pode induzir este processo (WAREING e AL-CHALABI, 1985).

A formação dos brotos em discos cotiledonares ocorreu nas margens, nas regiões próximas das nervuras. Na maioria dos segmentos de hipocótilo, os brotos adventícios foram formados primeiramente na extremidade proximal, enquanto que na extremidade distal ocorreu o intumescimento do explante, a formação de calos e, em alguns casos, também a formação de brotos. Em segmentos radiculares, a formação de brotos ocorreu predominantemente na extremidade proximal. Este comportamento morfogênico de diferentes regiões dos hipocótilos e das raízes, resultando em diferentes intensidades regenerativas, suscitou investigações sobre a existência de gradientes morfogênicos ao longo destes órgãos.

3.2 Potencial morfogênico de explantes ao longo do eixo hipocotiledonar e radicular

Explantes obtidos de diferentes posições no órgão de origem apresentaram diferentes intensidades de resposta quando cultivados no meio de cultura WPM, suplementado com 4,56 μ M de ZEA.

Há uma relação direta entre a distância do explante da região apical do órgão e o seu potencial morfogênico. À medida que aumentou a distância do explante dos ápices caulinar e radicular, aumentou a frequência de segmentos hipocotiledonares e radiculares com formação de brotos adventícios, estabelecendo um gradiente de potencial morfogênico que cresce do ápice em direção à base destes órgãos (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência (%) de explantes hipocotiledonares e radiculares de *Bixa orellana* L. com formação de brotos adventícios, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio de cultura WPM, suplementado com 4,56 μ M de zeatina

Posição	Frequência organogênica em explantes (%)**	
	Hipocotiledonares *	Radiculares *
Apical	62,5 \pm 10,2 b	22,5 \pm 9,8 b
Mediana	68,7 \pm 6,5 b	30,0 \pm 10,5 b
Basal	83,7 \pm 8,4 a	41,2 \pm 8,4 a

Médias \pm desvio padrão de 5 repetições de 8 explantes.

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

*Dados obtidos de dois experimentos independentes.

**Dados transformados em arc sen [raiz (x/100)].

A habilidade de segmentos de hipocótilos em regenerar brotos adventícios, em função da posição no órgão, foi relatada também para outras espécies lenhosas. Em *Annona squamosa*, os segmentos hipocotiledonares mais próximos do nó cotiledonar apresentaram menor frequência de resposta e número de brotos adventícios, enquanto que os melhores resultados foram induzidos em explantes da posição sub-basal (NAGORI e PUROHIT, 2004). Em *B. orellana*, Carvalho (2000) e Carvalho et al. (2005b) também observaram que a maior frequência (90%) de explantes hipocotiledonares com formação de brotos adventícios foi induzida em

segmentos retirados da posição sub-basal, e que a frequência de regeneração diminuiu nos explantes mais próximos do nó cotiledonar e da posição basal, quando cultivados em meio de cultura MS, suplementado com ZEA 0,5 mg.L⁻¹ e AIA 0,05 mg.L⁻¹.

Os resultados diferenciados, observados neste trabalho e os encontrados por Carvalho (2000) e Carvalho et al. (2005b), em relação à posição mais responsiva dos segmentos de hipocótilos de urucum, poderiam ser atribuídos aos diferentes genótipos, meios de cultura e reguladores de crescimento utilizados no cultivo do explantes.

O gradiente de resposta do ápice para a base dos hipocótilos de urucum, com a região distal sendo mais responsiva verificado neste trabalho, também foi observado em *Annona squamosa*, por Nagori e Purohit (2004), que atribuíram estes resultados a variações na concentração endógena de auxina nas diferentes regiões do órgão de origem dos explantes. Segundo Cline (1991), o transporte polar basípeto de AIA, gera um gradiente de auxina ao longo do órgão e, conseqüentemente, uma diferente relação auxina/citocinina se estabelece em diferentes regiões. Portanto, em regiões de maior regeneração de brotos adventícios, esta relação estaria mais favorável à citocinina.

Segmentos radiculares de urucum apresentaram o mesmo comportamento dos segmentos hipocotiledonares. A frequência de explantes com formação de brotos adventícios foi maior em segmentos da base das raízes (41,2%), e diminuiu em segmentos das posições mediana e apical (Tabela 2).

Segmentos radiculares apicais mantiveram a atividade do meristema apical, alongando, em alguns casos, mais de duas vezes o comprimento inicial (10 mm). Este comportamento dos segmentos apicais radiculares pode estar relacionado com a menor capacidade de regeneração de brotos adventícios. O comportamento *in vitro* de explantes radiculares, dependeria, segundo Kerbauy (1998), da proporção de zonas de crescimento, pois estas implicam na ocorrência de padrões estruturais e fisiológicos distintos, e em regimes hormonais diferentes nos sítios formadores de órgãos ao longo do eixo radicular.

Considerando a superioridade dos segmentos hipocotiledonares da posição basal sobre os demais, e sobre os explantes radiculares, em relação à frequência de regeneração de brotos adventícios, foram utilizados nos experimentos subseqüentes explantes da base dos hipocótilos de urucum.

3.3 Efeito de diferentes citocininas na indução de brotos adventícios em explantes hipocotiledonares

Todas as citocininas testadas induziram a formação de brotos adventícios nos explantes hipocotiledonares (Tabela 3). A frequência de regeneração, sem a adição de citocininas (controle), foi de 7,5%.

Comparando os diferentes tipos de citocininas (Tabela 3), observa-se que as melhores respostas foram obtidas com TDZ (85%) e ZEA (80%). O BAP induziu a formação de brotos em 62% dos explantes, enquanto que com o 2iP foram observadas as menores frequências (46%).

Tabela 3 – Efeito de diferentes citocininas sobre a frequência (%) de explantes basais hipocotiledonares de *Bixa orellana* L. com formação de brotos adventícios, brotos alongados e hiperidridificados, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio de cultura WPM

Citocininas (4,56 µM)	Frequência de explantes (%) *		
	Broto adventícios	Broto alongados**	Broto hiperidridificados
Controle	7,5 ± 6,8 d	7,5 ± 0,0 c	0,0 ± 0,0 c
ZEA	80,0 ± 6,8 a	45,0 ± 6,8 a	31,9 ± 8,4 b
BAP	62,0 ± 6,8 b	22,5 ± 10,4 b	38,3 ± 11,0 ab
TDZ	85,0 ± 10,4 a	7,5 ± 6,8 c	45,1 ± 14,3 a
2iP	46,0 ± 11,8 c	20,6 ± 8,4 b	30,0 ± 6,8 b

Médias ± desvio padrão de 5 repetições de 6 explantes.

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

*Dados transformados em arc sen [raiz (x/100)].

**Broto maiores do que 5 mm de comprimento.

As citocininas induzem variados tipos e intensidades de respostas em explantes de diferentes espécies e genótipos de uma mesma espécie. Em urucum, trabalhos relatam os efeitos variados das citocininas sobre a regeneração de brotos adventícios em explantes juvenis. Em estudos realizados por Carvalho (2000) e Carvalho et al. (2005b), o BAP (0,5 mg.L⁻¹) foi mais efetivo que a ZEA, na mesma concentração, na frequência de

explantes de hipocótilo com formação de brotos adventícios e no número de brotos formados por explante, porém a ZEA proporcionou maior alongamento dos brotos, mesmo induzindo a formação de calos.

D'Souza e Sharon (2001) ao avaliarem os efeitos do 2iP, BAP e KIN no cultivo de ápices e segmentos nodais de plântulas de urucum, observaram que a KIN não induziu a formação de brotos, o BAP e a KIN provocaram a formação de calos, enquanto que o 2iP (2,0 e 3,0 mg.L⁻¹), proporcionou maior número e comprimento dos brotos. Cultivando segmentos de hipocótilos e hipocótilos enraizados de urucum, em meio MS, Paiva Neto et al. (2003b) observaram que o TDZ e a ZEA (4,56 uM) foram mais efetivos do que o BAP na frequência organogênica, porém, o TDZ provocou a formação de brotações em forma de rosetas e altos níveis de divisão mitótica, resultando em várias zonas de proliferação celular (calos) nos explantes. Com ZEA, no entanto, a formação de meristemóides ocorreu diretamente nos explantes, resultando em brotos maiores, mais fáceis de alongar e enraizar.

O desenvolvimento e a qualidade dos brotos adventícios, formados em segmentos basais de hipocótilos de urucum, também foram influenciados pelo tipo de citocinina (Tabela 3). A ZEA foi a citocinina que proporcionou melhor desenvolvimento dos brotos, quando comparada com as demais. Em 45% dos explantes cultivados na presença de ZEA, houve formação de brotos adventícios alongados, com comprimento superior a 5 mm, e mais facilmente individualizáveis. Não houve diferença significativa entre o BAP e o 2iP quanto à frequência de explantes com formação de brotos alongados, porém o TDZ provocou inibição do alongamento dos brotos.

A formação de brotos atípicos, de aspecto vítreo, com folhas quebradiças e translúcidas, características do processo de hiperidrigificação, foi observada nos explantes quando cultivados na presença de algum tipo de citocinina (Tabela 3). Estes resultados demonstram que as citocininas, na concentração em que foram incorporadas ao meio WPM, provocaram certo grau de toxicidade nas culturas. A redução na concentração das citocininas na fase de indução de brotos, poderia reduzir estes efeitos indesejáveis.

Condições especiais estabelecidas durante o cultivo, podem induzir a hiperidricidade em plantas regeneradas *in vitro*, acarretando, geralmente, a morte das plantas. Segundo Ziv (1991), a hiperidricidade é uma desordem fisiológica relacionada a alguma reação de estresse, provocada por fatores como alta umidade relativa no interior do frasco de cultura, baixa transpiração do explante, constituição de nutrientes no meio de cultura e, especialmente, altas concentrações de citocinina durante o cultivo.

A organização ultraestrutural de folhas hiperídricas de *Capsicum annuum*, revelou a presença de cloroplastos contendo tilacóides desorganizados, menor número de grana, acúmulo de grandes grãos de amido, e ausência ou pequeno acúmulo de plastoglóbulos (FONTES et al., 1999). Brotos hiperídricos de *Simmondsia chinensis* apresentaram hipertrofia do mesofilo foliar e do córtex do caule, estômatos mal formados, descontinuidade da epiderme e hipolignificação do xilema (APÓSTOLO e LLORENT, 2000).

3.4 Enraizamento de brotos adventícios

A análise da variância revelou significância estatística para os efeitos do AIB sobre a frequência de brotos adventícios enraizados e o número médio de raízes por broto.

Não houve formação de raízes nos brotos adventícios de urucum cultivados em meio WPM, na ausência de AIB (controle). O melhor resultado de enraizamento foi observado com 4,9 μM de AIB (Figura 1), em que 25% dos brotos formaram raízes no período de 30 dias de cultivo. Em concentrações acima de 4,9 μM , o AIB induziu menores frequências de brotos enraizados.

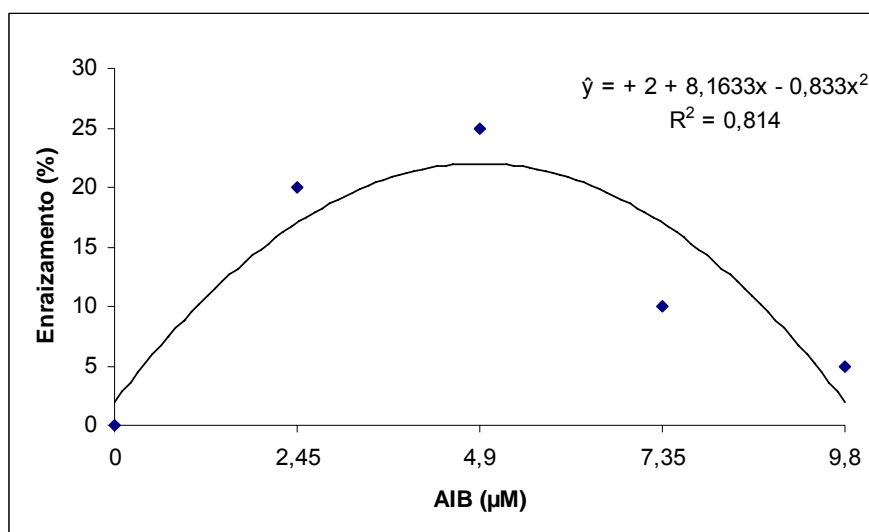


Figura 1 – Freqüência (%) de brotos adventícios de urucum (*Bixa orellana* L.) enraizados após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura WPM, com diferentes concentrações de AIB.

O número médio de raízes nos brotos de urucum também foi influenciado pela concentração do AIB. O aumento na concentração da auxina foi acompanhado pelo aumento no número de raízes emitidas por explante, até a concentração de 4,9 µM, reduzindo nas concentrações superiores (Figura 2).

Em média, 2 raízes foram formadas por broto, quando cultivados na presença de 4,9 µM de AIB, sendo que com o dobro desta concentração (9,8 µM), o número médio de raízes diminuiu para 0,2 (Figura 2). Utilizando AIB a 4,9 µM, Carvalho (2000) observou a formação de cerca de 9,8 raízes por broto de urucum. No entanto, os brotos foram formados em meio MS com 0,5 mg.L⁻¹ de ZEA e 0,05 mg.L⁻¹ de AIA, condição em que o processo rizogênico pode ter sido favorecido.

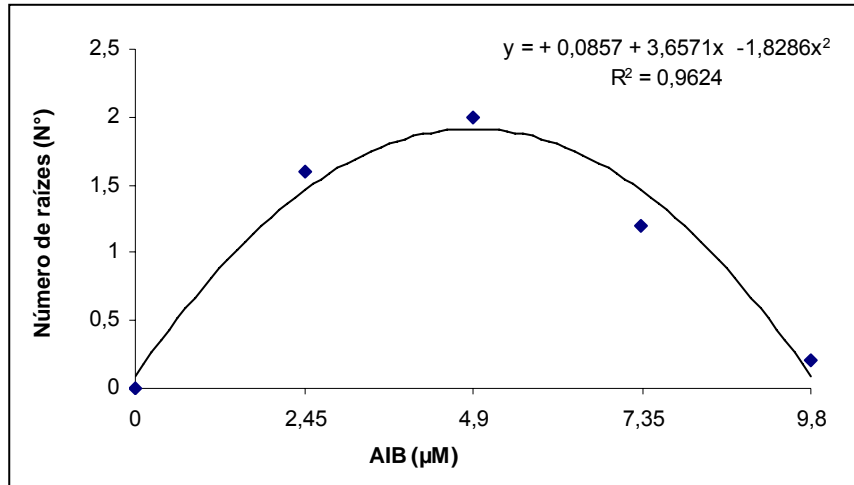


Figura 2 – Número de raízes formadas em brotos adventícios de urucum (*Bixa orellana* L.), após 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio de cultura WPM, com diferentes concentrações de AIB.

As raízes formadas nos brotos de urucum, nos diferentes tratamentos com AIB, não alongaram durante os 30 dias de cultivo *in vitro* ou na fase de aclimatização das plantas em casa de vegetação. Esta dificuldade no alongamento radicular pode estar relacionada com as condições de cultivo na fase de indução dos brotos. Os brotos submetidos ao processo de enraizamento foram formados nos segmentos de hipocótilo cultivados na presença de ZEA 4,56 μM. Nesta condição, 80% dos explantes regeneraram brotos adventícios, porém, 31,9% apresentaram brotos com sintomas de hiperidrificação, causados, provavelmente, pela concentração de citocinina que pode ter sido muito elevada. Embora tenham sido utilizados brotos alongados para este experimento de enraizamento, os efeitos da citocinina podem ter se manifestado nesta fase, interferido na indução e no desenvolvimento radicular.

3.5 Evidências morfológicas e histológicas da organogênese e regeneração de plantas

As observações morfológicas e histológicas revelaram que a rota morfogênica, induzida em explantes juvenis de *B orellana*, resultou na formação de brotos adventícios.

Os diferentes estágios da regeneração de plantas de urucum, a partir de explantes hipocotiledonares, são ilustrados na Figura 3. Independentemente do meio de cultura, do tipo de citocinina e da posição do segmento no eixo hipocotiledonar, houve assincronia na formação de brotos adventícios. Aos 30 dias de cultivo, em meio WPM com adição de 4,56 μ M das citocininas ZEA (Figura 3A), BAP (Figura 3B), TDZ (Figura 3C) e 2iP (Figura 3D), alguns explantes apresentaram brotos evidentes, com folhas típicas e bem formadas, enquanto outros explantes exibiam o início do processo organogênico.

A formação de brotos adventícios ocorreu, primeiramente, na extremidade proximal da maioria dos segmentos de hipocótilo, enquanto que o intumescimento, e às vezes pequenos calos, eram formados na extremidade distal (Figura 3E e F), ou ainda, concomitantemente, nas duas extremidades dos explantes (Figura 3G). Pequenos calos branco-amarelados, de aspecto friável, se formaram nas extremidades de alguns explantes, sempre após o desenvolvimento dos brotos (Figura 3H).

Em segmentos de hipocótilo, as primeiras mudanças na estrutura anatômica foram evidenciadas aos 5 dias de cultivo (Figura 4A), quando divisões periclinais, principalmente, foram induzidas em células epidérmicas e subepidérmicas do explante (Figura 4B). Aos 10 dias de cultivo, após contínuas divisões periclinais e anticlinais, as células parenquimáticas da região mais externa do córtex adquiriram aparência meristemática, resultante de uma provável desdiferenciação. Estas células apresentaram formas isodiamétricas, vacúolos pequenos, citoplasma denso e núcleo proeminente, distintas das células parenquimáticas adjacentes (Figura 4C).

A desdiferenciação em células meristemáticas progrediu ao longo do período de cultivo e, aos 15 dias, pequenos centros meristemáticos se tornaram visíveis (Figura 4D), ao mesmo tempo em que divisões mitóticas ocorriam em células epidérmicas e parenquimáticas do córtex, formando calos em alguns explantes. Os centros meristemáticos resultaram na organização de meristemóides (Figura 5A), observados como discretos nódulos, antes do desenvolvimento dos brotos adventícios nas extremidades dos explantes. Aos 20 dias, com o desenvolvimento dos meristemóides, foi possível visualizar a organização de meristemas apicais de brotos

adventícios, a formação de dois primórdios foliares, lateralmente ao meristema central, e a presença de células vasculares (Figura 5B).

Conexões vasculares entre o novo meristema e o tecido original do explante, característica da organogênese, se tornaram evidentes aos 25 dias (Figura 5C). As análises histológicas, realizadas nos segmentos hipocotiledonares de urucum, revelaram que a organização progressiva dos centros meristemáticos em meristemas apicais caulinares e primórdios foliares, resultou na diferenciação estrutural de brotos adventícios (Figura 5D), aos 30 dias de cultivo *in vitro* destes explantes.

Os brotos adventícios, regenerados a partir dos segmentos de hipocótilo desenvolveram raízes, e após 60 dias de cultivo *in vitro* (Figura 3I), foram transferidos para recipientes contendo vermiculita (Figura 3J), aclimatizados e cultivados com sucesso em casa de vegetação.

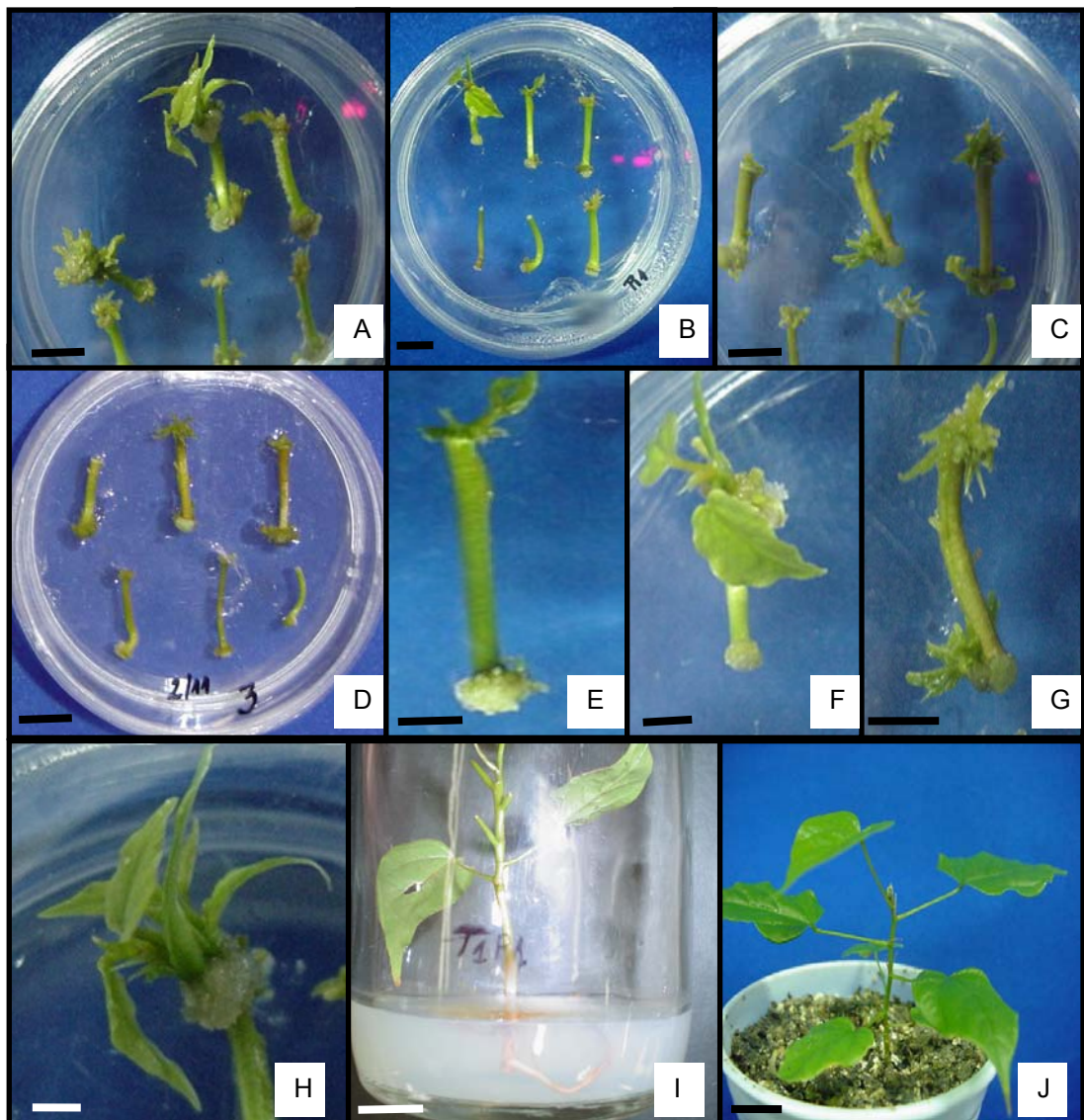


Figura 3 – Organogênese e regeneração de plantas de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de explantes hipocotiledonares. Brotos adventícios formados em segmentos de hipocótilo, aos 30 dias de cultivo em meio WPM com 4,56 μ M de: A - ZEA; B - BAP; C - TDZ; D - 2iP. E - broto adventício formado na extremidade proximal do explante; F - broto adventício formado na extremidade proximal, e pequeno calo na extremidade distal do explante; G - brotos adventícios formados nas duas extremidades do explante; H - calo branco-amarelado de aspecto friável formado na base do broto; I - sistema radicular formado em broto adventício, aos 60 dias de cultivo; J - planta enraizada transferida para recipiente contendo vermiculita, em processo de aclimatização. Barras: A - D = 5 mm; E - H = 2,5 mm; I - J = 10 mm.

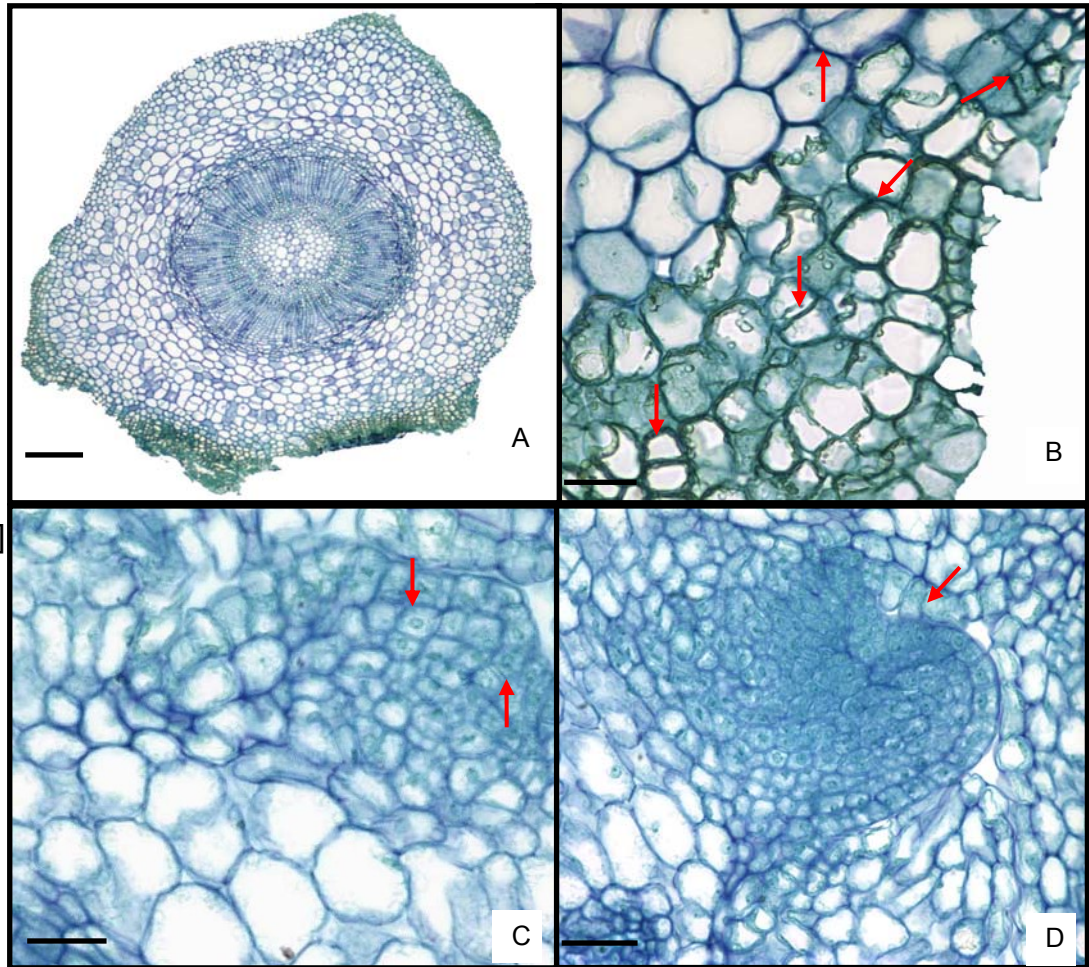


Figura 4 – Evidências histológicas do processo organogênico em segmentos de hipocótilo de urucum (*Bixa orellana* L.), cultivados em meio de cultura WPM, suplementado com 4,56 μ M de ZEA. A ao D - Fotomicrografias de cortes transversais. A e B - início das proliferações celulares epidérmicas e subepidérmicas, aos 5 dias de cultivo, evidenciando, em B, os planos de divisões celulares (setas); C - centro meristemático, constituído de células isodiamétricas com alta relação núcleo/citoplasma (setas), aos 10 dias de cultivo; D - centro meristemático, aos 15 dias, evidenciando o domo apical do futuro meristema caulinar (seta). Barras: A = 200 μ m; B - D = 50 μ m.

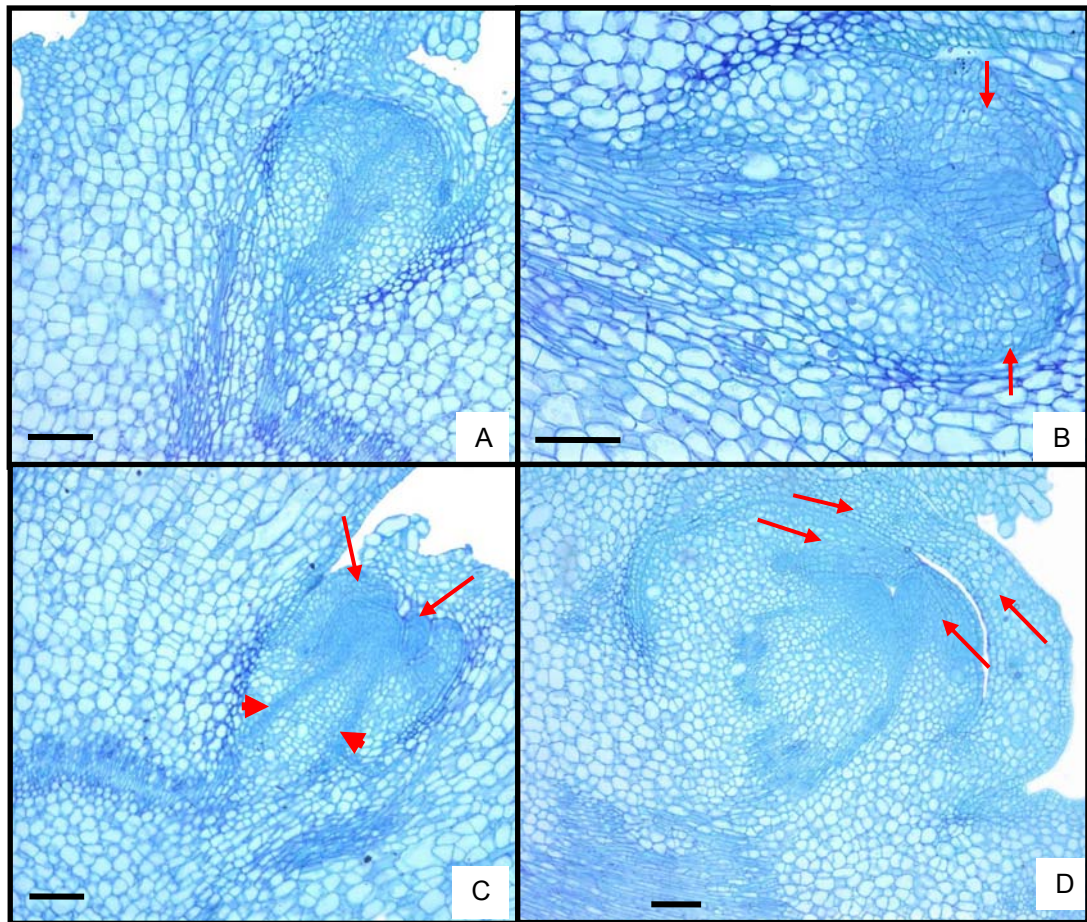


Figura 5 – Evidências histológicas do processo organogênico em segmentos de hipocótilo de urucum (*Bixa orellana* L.), cultivados em meio de cultura WPM, suplementado com 4,56 μ M de ZEA. A ao D - Fotomicrografias de cortes transversais. A - meristemóides aos 20 dias; B - meristema apical de broto adventício e presença de dois primórdios foliares (setas) lateralmente ao meristema central; C - broto adventício em conexão vascular (pontas de setas) com o explante, característica da organogênese, e dois pares de primórdios foliares (setas), aos 25 dias de cultivo; D - broto adventício com dois pares de primórdios foliares (setas), aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Barras = 200 μ m.

4 CONCLUSÕES

A diferenciação direta de brotos adventícios em explantes juvenis possibilita estabelecer um sistema de regeneração *in vitro* de plantas de urucum (*Bixa orellana* L.).

A ZEA, a 4,56 μM , adicionada ao meio WPM, induz altas frequências de regeneração de brotos em segmentos hipocotiledonares (86,2%), discos cotiledonares (40%) e segmentos radiculares (31,2%). O TDZ e a ZEA a 4,56 μM , são mais efetivos que o BAP e o 2iP na indução organogênica em segmentos hipocotiledonares. A ZEA proporciona melhor desenvolvimento dos brotos enquanto que o TDZ induz maior frequência de hiperidrificação. O AIB, a 4,9 μM , proporciona a maior frequência de enraizamento de brotos (25%) e número de raízes por broto (2).

Existe um gradiente de potencial morfogênico que cresce do ápice em direção à base dos hipocótilos e raízes.

Análises histológicas comprovam a origem adventícia dos brotos, a partir da organização direta de centros meristemáticos em regiões externas do córtex dos segmentos de hipocótilo. As plantas regeneradas foram aclimatizadas com sucesso em casa de vegetação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNER, A.R.; BARBISAN, L.F.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D.M.F. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1687-1693, 2004.
- APÓSTOLO, N.M.; LLORENTE, B. Anatomy of normal and hyperhydric leaves and shoots of *in vitro* grown *Simmondsi chinensis* (Link) Schn. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 36, p. 243-249, 2000.
- BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. **Plant tissue culture: theory and practice** developments in crop science. Oxford: Elsevier Science, 1983, v. 5. 488 p.
- BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CÂMARA, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, v. 300, p 2089-2091, 2003.
- CARVALHO, J.F.R.P. **Análise cariotípica e indução *in vitro* de poliploidia em urucum (*Bixa orellana* L.)**. 2000. 124 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2000.
- CARVALHO, D.C. de; BIASI, L.A. Organogênese do caquizeiro a partir de segmentos radiculares. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1401-1406, 2004.
- CARVALHO, J.F.R.P de; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, n. 1, p. 69-75, 2005a.
- CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, v. 29, p. 887-895, 2005b.
- CLINE, M.G. Apical dominance. **The Botanical Review**, v. 57, n. 4, p. 318-358, 1991.
- CUNNINGHAM, Jr. F.X., GRANTT, E. Genes and enzymes of catotenoid biosynthesis in plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 557-583, 1998.
- D'SOUZA, M.C.; SHARON, M. *In vitro* clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 37, p. 168-172, 2001.
- FONTES, M.A.; OTONI, W.C.; CAROLINO, S.M.B.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B.; FÁRI, M.; LOURO, R.P. Hyperhydricity in pepper plants regenerated *in vitro*: involvement of BiP (Binding Protein) and ultrastructural aspects. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 81-87, 1999.
- FLEISCHER, T.C.; AMEADE, E.P.K.; MENSAH, M.L.K.; SAWER, I.K. Antimicrobial activity of leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 136-138, 2003
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, A.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA - SPI/EMBRAPA – CNPH, 1999. v. 2, p. 533-568.
- JAKO, C.; COUTU, C.; ROEWER, I.; REED, D.W.; PELCHER, L.E.; COVELLO, P.S. Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis. **Plant Science**, v. 163, p. 141-145, 2002.
- KERBAUY, G.B. Cultura de raízes e regeneração de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, A.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA - SPI/EMBRAPA – CNPH, 1998. v.1, p.161-181.
- KIOKIAS, S.; GORDON, M.H. Antioxidant properties of annatto carotenoids. **Food Chemistry**, v. 83, p. 523-529, 2003.
- LAURO, G.J. A primer on natural colors. **Cereal Foods World**, v. 36, n. 11, p. 949-953, 1991.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MACHADO, M.P.; BIASI, L.A.; RITTER, M.; RIBAS, L.L.F.; KOEHLER, H.S.; ZANETTE, F. Meios de cultura na micropropagação do porta-enxerto de videira “VR 043-43” (*Vitis vinifera* X *Vitis rotundifolia*). **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 277-280, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAGORI, R.; PUROHIT, S.D. *In vitro* plantlet regeneration in *Annona squamosa* through direct shoot bud differentiation on hypocotyls segments. **Scientia Horticulturae**, v. 99, p. 89-98, 2004.
- NAS, M.N.; READ, P.E. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. **Scientia Horticulturae**, v. 101, p. 189-200, 2004.
- PAIVA NETO, V.B.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Mannose - a potential selection system for genetic transformation of annatto (*Bixa orellana* L.). **Biologia Plantarum**, v. 47, n. 3, p. 441-444, 2003 a.
- PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.,R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, n. 4, p. 32-38, 2003 b.
- PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. High cytokinin accumulation following root tip escisión changes the endogenous auxin to cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 1002 – 1006, 1999.

PERES, L.E.P.; MORGANTE, P.G.; VECCHI, C.; KRAUS, J.E.; VAN SLUYS, M.A. Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of tomato cultivars and wild related species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 37-44, 2001.

PINHEIRO, A.L.; ALMEIDA, E.C. de. Avaliação de um híbrido artificial obtido entre duas variedades de urucum (*Bixa orellana* L.) em Viçosa – Minas Gerais. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v.1, n.1. p. 31-35, 1992.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 38, p. 116-124, 2002.

SINGH, S.K.; MEGHWAL, P.R.; SHARMA, H.C.; SINGH, S.P. Direct shoot organogenesis on hypocotyls explants from *in vitro* germinated seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda. **Scientia Horticulturae**, v. 95, p. 213-221, 2002.

WAREING, P.F., AL-CHALABI, T. Determination in plant cells. **Biologia Plantarum**, v. 27, p. 24-248, 1985.

ZALDÍVAR-CRUZ, J.M.; BALLINA-GÓMEZ, H.; GUERRERO-RODRÍGUEZ, C.; AVILÉS-BERZUNZA, E.; GODOY-HERNANDÉZ, G.C. *Agrobacterium*-mediated transient transformation of annatto (*Bixa orellana*) hypocotyls with the gus reporter gene. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 281-284, 2003.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 45-69.

CAPÍTULO V

CALOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES DE PLANTAS ADULTAS DE *Ginkgo biloba* L. E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

RESUMO

Avaliou-se diferentes reguladores de crescimento, carboidratos e regimes de luz na produção de calos em diferentes tipos de explantes foliares, bem como a produção de metabólitos secundários em folhas de plantas adultas, de plantas regeneradas *in vitro* e calos de *Ginkgo biloba* L. A calogênese em ginkgo é dependente de uma fonte exógena de auxina. As mais altas freqüências calogênicas foram induzidas em discos foliares, cultivados em meio MS com as combinações de ANA 4,4 µM e BAP 0,4 µM (100%) e ANA 4,4 µM e BAP 4,4 µM (92%). Discos foliares e segmentos de pecíolos responderam em maior freqüência ao meio de indução de calos, em relação aos discos da base foliar contendo parte do pecíolo. A combinação de ANA 4,4 µM e BAP 0,4 µM, induziu maior freqüência calogênica em discos foliares do que as combinações de ANA e KIN, 2,4D e BAP, e 2,4D e KIN, nas mesmas concentrações. A máxima produção de massa fresca de calos, em três subcultivos, foi obtida com o carboidrato sacarose e na ausência de luz. Calos primários, induzidos nos diferentes explantes apresentaram coloração branco-amarelada e estrutura friável, independentemente das condições de cultivo. Calos subcultivados na presença isolada de ANA mantiveram o padrão de cor e estrutura, e quando subcultivados na presença de BAP tornaram-se esverdeados e compactos. Os terpenóides ginkgolídeos A e B, e os glicosídeos flavonóides quercetina, camferol e rutina, não foram detectados nos calos ou folhas de *G. biloba* por TLC e HPLC.

Palavras-chave: reguladores de crescimento, carboidratos, regime de luz, ginkgolídeos, glicosídeos flavonóides.

1 INTRODUÇÃO

Ginkgo biloba L. é uma gimnosperma arbórea originária da China, único representante vivo do grupo das Ginkgophytas (família Ginkgoaceae), datada do período Permiano (GIFFORD e FOSTER, 1989; BRENNER et al., 2005). Esta espécie é cultivada como ornamental em diferentes países, porém são as suas propriedades medicinais que despertam maior interesse.

Os principais compostos sintetizados pelo ginkgo são lactonas terpênicas, como os ginkgolídeos A, B, C, J e M (diterpenos), o bilobalídeo (sesquiterpeno), e os glicosídeos flavonóides quercetina, camferol e isoramnetina (VAN BEEK, 2002). Estes metabólitos são amplamente utilizados na medicina pelas propriedades terapêuticas, relacionadas principalmente à regulação da circulação sanguínea cerebral e proteção contra radicais livres (CURTIS-PRIOR et al., 1999). Estudos sugerem que extratos de ginkgo podem reduzir a progressão do mal de Alzheimer (BIRKS et al., 2002).

Os metabólitos sintetizados pelo ginkgo são acumulados nas folhas, cascas e raízes (VAN BEEK, 2002). As indústrias farmacêuticas têm explorado o potencial medicinal destes compostos, mediante a produção de extratos padronizados, extraídos principalmente das folhas. Segundo Gray et al. (2006), bilhões de doses anuais de medicamentos a base dos compostos de ginkgo foram comercializados nos Estados Unidos e na Europa, em duas décadas. Contudo, existem dificuldades para suprir a demanda por estes compostos. Apenas os Estados Unidos e França cultivam o ginkgo em larga escala para fins industriais (CAMPER et al., 1997; SOHIER e COURTOIS, 2007).

A produção dos compostos medicinais em plantas de ginkgo, especialmente os de maior interesse, como os ginkgolídeos e o bilobalídeo, pode variar em função da sazonalidade, sexo e idade das plantas (BALZ et al., 1999; KANG et al., 2006; SOHIER e COURTOIS, 2007). No entanto, a possibilidade de produzir estes metabólitos secundários *in vitro*, a partir do cultivo de calos e suspensões celulares, tem despertado crescente interesse em pesquisas nesta área (CARRIER et al., 1991; CAMPER et al., 1997; BALZ et al., 1999; YU et al., 1999, 2004; KANG et al., 2006; GRAY et al., 2006; SOHIER e COURTOIS, 2007).

Tecnologias de transferência de genes, utilizando *Agrobacterium rhizogenes* e *A. tumefaciens* (BALZ et al., 1999; DUPRÉ et al., 2000), e a utilização de substâncias elicitoras da biossíntese de metabólitos secundários em culturas celulares de ginkgo (KANG et al., 2006), têm sido utilizadas visando aumentar a produtividade dos compostos de interesse.

Estudos têm demonstrado os efeitos de diferentes fatores físicos e de substâncias químicas na indução e no desenvolvimento *in vitro* de calos, e na produção de ginkgolídeos e bilobalídeo em culturas celulares de ginkgo (CAMPER et al., 1997; BALZ et al., 1999; YU et al., 1999, 2004; KANG et al., 2006), porém, pouca atenção tem sido dada à utilização de explantes de plantas adultas para a produção de calos e para a produção *in vitro* de metabólitos secundários nestes calos.

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos de diferentes reguladores de crescimento, carboidratos e regimes de luz, na indução e desenvolvimento de calos, a partir de diferentes explantes foliares de plantas adultas de *Ginkgo biloba*, e avaliar a produção de metabólitos secundários de interesse medicinal nestes calos, em folhas produzidas *in vitro* e em folhas de plantas adultas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV, e no Laboratório de Cromatografia da Faculdade de Farmácia, da Universidade de Passo Fundo – UPF, RS, no período de março de 2005 a março de 2007.

2.1 Material vegetal e obtenção de explantes

Plantas matrizes de *Ginkgo biloba*, produzidas a partir de estacas, com aproximadamente 5 anos de idade e em estágio reprodutivo (Figura 1A), foram utilizadas como fontes de explantes para diferentes experimentos.

As plantas matrizes foram cultivadas em casa de vegetação, sob tratamentos fitossanitários, com pulverizações semanais intercaladas de soluções de fungicidas sistêmicos e de contato. As adubações foram feitas quinzenalmente com a formulação de adubo Ouro Verde (Takenaka S.A. Indústria e Comércio, São Paulo), através da água de irrigação, diretamente no substrato.

Folhas totalmente expandidas, coletadas das plantas matrizes, foram utilizadas como fontes de explantes. As folhas foram desinfestadas em condições assépticas, com soluções de etanol 70% (v/v), por 1 minuto, água sanitária 50% (v/v), com 2,5% de cloro ativo, acrescida de Tween-20 0,1% (v/v), por 10 minutos e, enxaguadas por três vezes com água destilada e autoclavada.

Após o processo de desinfestação das folhas, foram excisados discos foliares, de 6 mm de diâmetro, da lâmina foliar e da base da lâmina foliar, contendo parte do pecíolo, e segmentos de pecíolo de 10 mm de comprimento (Figura 1B).

2.2 Efeitos do balanço auxina/citocinina na indução de calos em discos foliares

Para a fase de indução de calos, discos foliares excisados da lâmina foliar, foram cultivados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), adicionado de ANA (ácido α -naftalenoacético) e BAP (6-benzilaminopurina), em diferentes combinações, nas concentrações de 0; 0,4; 4,4; e 44,0 μ M. Os discos foliares foram inoculados com a face abaxial em contato com o meio de cultura.

Aos 30 dias de cultivo avaliou-se a frequência de explantes com formação de calos. O experimento foi repetido uma vez, em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições (placas de Petri) de 5 explantes.

2.3 Influência do tipo de explante foliar na indução de calos

Foram avaliados discos excisados da lâmina foliar, da base da lâmina foliar, contendo parte do pecíolo, e segmentos de pecíolo (Figura 1B). Os explantes foram cultivados horizontalmente, com a face abaxial em contato com o meio de cultura MS, suplementado com ANA 4,4 μ M e BAP 0,4 μ M.

Aos 30 dias de cultivo avaliou-se a frequência de explantes com formação de calos. O experimento foi repetido uma vez, em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições (placas de Petri) de 5 explantes.

2.4 Efeitos do tipo de auxina e de citocinina na indução de calos em discos foliares

Discos foliares excisados da lâmina foliar, foram cultivados em meio de cultura MS, suplementado com diferentes reguladores de crescimento nas seguintes combinações: ANA 4,4 μ M e BAP 0,4 μ M; ANA 4,4 μ M e KIN (cinetina) 0,4 μ M; 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) 4,4 μ M e BAP 0,4 μ M e 2,4-D 4,4 μ M e KIN 0,4 μ M. Os discos foliares foram inoculados com a face abaxial em contato com o meio de cultura.

Avaliou-se, aos 30 dias de cultivo, a frequência de explantes com formação de calos. O experimento foi repetido uma vez, em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições (placas de Petri) de 5 explantes.

2.5 Efeitos de diferentes carboidratos no desenvolvimento de calos

Para investigar os efeitos de diferentes carboidratos, foram utilizados calos, induzidos em discos da lâmina foliar, cultivados em meio MS com ANA 4,4 μM e BAP 0,4 μM . Avaliou-se os carboidratos sacarose, glicose + frutose, galactose e maltose a 87,6 mM, no desenvolvimento de calos, em três subcultivos, no meio de cultura MS, suplementado com ANA 4,4 μM e BAP 0,4 μM , o mesmo meio utilizado na indução dos calos.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 6 repetições (placas de Petri) de 4 calos.

O peso inicial de cada calo, em cada subcultivo, foi de 200 mg. Após 21 dias de cultivo, os calos foram novamente pesados e transferidos para meio de cultura novo. A cada subcultivo foram determinadas as taxas de crescimento dos calos e, após 3 subcultivos, avaliada a produção média de massa fresca (mg) de calos, em resposta aos carboidratos.

A taxa de crescimento de cada calo, após cada subcultivo de 21 dias, foi determinada através da equação: $[\text{massa fresca final (mg)} - \text{massa fresca inicial (mg)}] / [\text{massa fresca inicial (mg)}]$.

2.6 Efeito do regime luminoso no desenvolvimento de calos

Foram avaliados os efeitos de três diferentes regimes de luz, no desenvolvimento de calos, em 3 subcultivos: 63 dias de escuro / 0 dias de luz; 42 dias de escuro / 21 dias de luz, 63 dias de luz / 0 dias de escuro.

O meio de cultura utilizado foi o MS, suplementado com ANA 4,4 μM e BAP 0,4 μM e sacarose 87,6 mM. Os calos utilizados neste experimento, foram induzidos em discos foliares, excisados da lâmina foliar, cultivados no meio MS, com ANA 4,4 μM e BAP 0,4 μM .

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições (placas de Petri) de 5 calos.

O peso inicial de cada calo, em cada subcultivo, foi de 200 mg. Após 21 dias de cultivo, os calos foram novamente pesados e transferidos para um meio de cultura novo. A cada subcultivo, foram determinadas as taxas de crescimento dos calos e, após 3 subcultivos, avaliada a produção média de massa fresca (mg) de calos, em resposta a cada regime luminoso.

2.7 Meio de cultura e condições ambientais utilizadas durante o cultivo *in vitro*

O meio de cultura utilizado em todos os experimentos foi o MS adicionado de 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 7,0 g.L⁻¹ de Ágar (Merck) e 87,6 mM de sacarose. O pH do meio de cultura foi ajustado em 5,7 ± 0,1, com NaOH ou HCl 0,1 N, depois da adição dos reguladores de crescimento. O meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C, e em processo de resfriamento, foi distribuído em alíquotas de 25 mL em placas de Petri de poliestireno descartáveis de 90 mm X 15 mm, vedadas com filme de PVC.

As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas, com irradiância aproximada de 36 μmol.m².s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil, e temperatura de 25 ± 2 °C.

2.8 Análise morfológica dos calos

Calos primários, induzidos diretamente sobre os diferentes explantes, e calos subcultivados nos diferentes experimentos, foram caracterizados quanto à cor e estrutura, e classificados conforme o padrão destas características.

2.9 Avaliações histológicas

Explantes foliares e calos, cultivados em meio de cultura com diferentes combinações de reguladores de crescimento, foram fixados em solução de Glutaraldeído 2% (em solução tampão Fosfato de Sódio de Sorenson), desidratados em série etílica, infiltrados e emblocados em

Historesina (Glicol Metacrilato), e seccionados transversalmente, com espessura de 8 μm , em micrótomo automático (Leica RM 2155).

Os cortes histológicos foram corados com Azul de Astra 0,5% e, posteriormente, montados em lâminas permanentes com bálsamo do Canadá.

As observações e a aquisição das imagens foram realizadas em microscópio de luz (Olympus AX70), com sistema U-Photo.

2.10 Avaliação da produção de metabólitos secundários em calos e folhas

A metodologia utilizada para a identificação dos metabólitos secundários em folhas e calos de *Ginkgo*, foi baseada nos trabalhos de Gray et al. (2006) e Kang et al. (2006), com adaptações.

Foram analisados folhas totalmente expandidas, coletadas das plantas matrizes, folhas produzidas em brotações *in vitro*, e calos cultivados em meio de cultura com ANA 44,0 μM e com a combinação de ANA 4,4 μM e BAP 0,4 μM , na presença e ausência de luz.

As folhas e os calos foram inicialmente pesados, para obtenção da massa fresca (mg), e posteriormente congelados, desidratados em liofilizador, triturados e novamente pesados, para a obtenção da massa seca (mg) e preparo das amostras para extração e identificação dos compostos.

A solução extrativa utilizada foi uma mistura de acetona:água (80:20 v/v), com uma relação droga:solvente de 10:1. As amostras foram submetidas a refluxo (90°C) por 10 minutos, filtradas e levadas à secura em evaporador rotatório. Para a análise dos extratos, as amostras foram retomadas com acetona ou metanol.

As análises da composição química das amostras foram realizadas por TLC ('Thin Layer Chromatography') e HPLC ('High Performance Liquid Chromatography'). Foram analisadas 3 repetições de cada amostra de material vegetal.

As condições cromatográficas utilizadas para as análises em TLC foram uma fase móvel, constituída de acetato de etila:tolueno:acetona (40:35:25 v/v), uma fase fixa, constituída de cromatofolhas de alumínio

(Merck[®] F₂₅₄), o agente revelador anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento e luz UV 254 e 366 nm.

Para as análises em HPLC, as condições cromatográficas foram uma fase móvel isocrática, constituída de metanol:água (60:40 v/v), coluna de fase reversa C 18, volume de injeção de 20 µL em fluxo de 0,8 mL.min⁻¹, e tempo de análise de 30 minutos. As amostras foram detectadas em comprimento de onda de 220 nm, empregando Cromatógrafo Líquido UV-Vis Perkin-Elmer Série 200.

Os padrões utilizados foram os ginkgolídeos A e B, Quercetina, Camferol e Rutina (Sigma[®], EUA).

2.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através da ANOVA (análise da variância), aplicando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para a comparação das médias, utilizando-se o programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas - Universidade Federal de Viçosa).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeitos do balanço auxina/citocinina na indução de calos em discos foliares

A indução do processo calogênico em discos foliares de plantas adultas de *Ginkgo biloba* L. foi essencialmente dependente da presença de auxina no meio de cultura. Não houve indução calogênica nos explantes quando cultivados na ausência de reguladores de crescimento, ou na presença isolada do BAP, independentemente da concentração utilizada (Tabela 1).

A frequência com que a calogênese foi induzida variou em função do balanço estabelecido entre as diferentes concentrações de ANA e BAP. Quando a auxina foi utilizada de forma isolada, o aumento na sua concentração, de 0,4 μM para 44 μM , foi acompanhado por aumento significativo na frequência calogênica, de 28% para 68%. Quando a auxina foi combinada com as diferentes concentrações de BAP, o aumento na frequência calogênica ocorreu até a concentração de 4,4 μM de ANA, sendo que a concentração mais alta da auxina, 44 μM , não promoveu aumento significativo na frequência calogênica (Tabela 1).

Desta forma, os melhores balanços auxina/citocinina, para a indução de calos em discos foliares de ginkgo, foram obtidos com 4,4 μM de ANA combinada com 0,4 μM ou 4,4 μM de BAP. Nestas condições, o processo calogênico foi induzido em 100% e 92% dos explantes, respectivamente, em um período de 30 dias de cultivo (Tabela 1).

Calos cicatriciais foram observados nas margens de alguns discos foliares (Figura 1C), quando cultivados na presença de baixa concentração de ANA, isoladamente ou em combinações com o BAP. Estes calos não apresentaram maior desenvolvimento durante os 30 dias de cultivo e, desta forma, não foram considerados para efeitos de cálculo estatístico.

Tabela 1 – Efeitos do balanço auxina/citocinina no meio de cultura MS, sobre a frequência (%) de discos foliares de plantas adultas de *Ginkgo biloba* L. com formação de calos, aos 30 dias de cultivo *in vitro*

BAP (μM)	Frequência calogênica (%)*			
	ANA (μM)			
	0,0	0,4	4,4	44,0
0,0	D 0,0 \pm 0,0 a	C 28,0 \pm 10,9 a	B 60,0 \pm 14,1 b	A 68,0 \pm 17,8 a
0,4	D 0,0 \pm 0,0 a	C 40,0 \pm 14,1 a	A 100,0 \pm 0,0 a	B 80,0 \pm 14,1 a
4,4	C 0,0 \pm 0,0 a	B 28,0 \pm 10,9 a	A 92,0 \pm 17,8 a	A 80,0 \pm 14,1 a
44,0	C 0,0 \pm 0,0 a	B 32,0 \pm 10,9 a	A 68,0 \pm 10,9 b	A 76,0 \pm 16,7 a

Médias \pm desvio padrão de 5 repetições de 5 explantes.

Médias precedidas da mesma letra na linha, e seguidas da mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

*Dados originais transformados em arco sen [raiz(x/100)].

A velocidade com que os calos formaram-se nos discos foliares, não foi influenciada pelas diferentes combinações entre ANA e BAP. A formação dos calos foi observada, inicialmente, aos 10 dias de cultivo dos explantes, como proliferações celulares nas margens dos discos foliares, geralmente associadas às regiões mais próximas das nervuras (Figura 1D), como resultado da divisão de células dos tecidos lesionados, induzidas pela presença dos reguladores de crescimento no meio de cultura. Aos 20 dias de cultivo, os calos foram observados sobre a epiderme dos discos foliares, ainda restritos às regiões das nervuras (Figura 1E).

O progresso no processo de divisão celular, resultou no desenvolvimento de calos sobre a superfície dos explantes, como observado aos 30 dias de cultivo (Figura 1E). Os calos primários, após destacados dos discos foliares e colocados em contato com o meio de cultura, mantiveram seu desenvolvimento, mas nos discos foliares não eram mais observadas proliferações celulares, indicando que neste estágio de desenvolvimento, as células do calo tiveram maior participação no progresso do processo calogênico do que aquelas do explante inicial.

A indução de processos calogênicos em tecidos diferenciados, como discos foliares é, geralmente, dependente de auxinas exógenas. Este processo ocorre pela dediferenciação das células de diferentes tecidos do explante, e progride, através de divisões celulares, resultando na formação

de um aglomerado, ou massa de células não organizadas, em crescimento desordenado e com certo grau de diferenciação (WAREING e AL-CHALABI, 1985).

A combinação entre auxinas e citocininas pode, em certas espécies, aumentar a frequência de indução e o crescimento de calos em diferentes tipos de explantes. Estudos realizados com explantes juvenis e embrionários de ginkgo utilizaram combinações entre auxinas e citocininas para a indução e manutenção do crescimento dos calos (CAMPER et al., 1997; YU et al., 1999; TOMMASI e SCARAMUZZI, 2004).

Em outras espécies, como em *Capraria biflora* (BRITO et al., 1995) e *Anacardium occidentale* (NERARTAVIS e MIRANDA, 1995), a combinação entre ANA e BAP, ou ANA e KIN, promoveram maior indução e crescimento dos calos em discos foliares e, também, a expressão morfogênica.

Explantes foliares de plantas adultas de caixeta (*Didymopanax morototoni*) mostram-se exclusivamente calogênicos, independentemente do balanço entre ANA e BAP, sendo que a calogênese foi induzida somente na presença de auxina, enquanto que explantes foliares de plantas produzidas *in vitro* mostraram-se organogênicos e embriogênicos, nas mesmas condições de cultivo (MANTOVANI, 1997; MANTOVANI e FRANCO, 2000).

Em explantes foliares de eucalipto, Alves et al. (2004) verificaram intensa atividade de divisões celulares nas regiões associadas aos feixes vasculares, que culminaram, em maior ou menor grau, na formação de calos, em função da combinação entre concentrações de auxinas e citocininas.

Segundo Van Eck e Kitto (1992), as proliferações celulares também observadas no início da formação de calos, nas margens dos discos foliares de 'Peppermint' e 'Orange mint', ocorrem normalmente a partir de células perivasculares, provavelmente devido aos maiores teores endógenos de reguladores de crescimento presentes nos tecidos vasculares.

A formação de calos nos discos foliares de ginkgo, cultivados na presença isolada de ANA, ou nas diferentes combinações entre ANA e BAP, indica que, em parte, o processo que leva a expressão *in vitro* de padrões morfogênicos, tenha sido ativado, como sugerido por Christianson e Warnick (1988). No entanto, estes calos primários não atingiram nenhum grau de

organização, que resultasse na expressão de vias morfogênicas, durante os 30 dias de cultivo dos explantes. Mesmo quando subcultivados em meio de cultura, com as concentrações iniciais dos reguladores de crescimento alteradas para um balanço favorável às citocininas, nenhum tipo de resposta morfogênica foi observada nestes calos.

A ausência de regeneração nos calos de ginkgo leva a crer que, de alguma forma, os processos seguintes de indução à competência, determinação e rediferenciação celular, não tenham sido ativados. Nos discos foliares também não foram identificados indícios de regeneração direta. Altas intensidades de determinação e diferenciação das células dos tecidos foliares podem ter interferido na capacidade de readquirir novas competências, condição necessária para a expressão de processos regenerativos. As condições de cultivo, como o meio de cultura, tipos, de reguladores de crescimento, suas concentrações e combinações, utilizadas neste trabalho, podem, também, estar associados à falha de regeneração dos explantes e dos calos de ginkgo.

3.2. Influência do tipo de explante foliar na indução de calos

A freqüência de indução de calos em ginkgo foi influenciada pelo tipo de explante foliar utilizado. Em meio de cultura MS, contendo ANA 4,4 μ M e BAP 0,4 μ M, discos retirados da lâmina foliar e segmentos de pecíolo foram mais responsivos do que os discos retirados da base da lâmina foliar, contendo parte do pecíolo. No entanto, não houve diferença significativa entre as freqüências calogênicas induzidas em discos retirados da lâmina foliar (98%) e segmentos de pecíolo (90%), (Tabela 2).

Uma das características mais distintivas do ginkgo é a morfologia da folha, que consiste de um longo pecíolo contendo dois sistemas de feixes que vascularizam a lâmina, geralmente bilobulada, mantendo um padrão regular de venação do tipo dicotômica aberta, em forma de leque (GIFFORD e FOSTER, 1989). A partir da base da folha, o sistema de venação se ramifica, os tecidos parenquimáticos passam a ocupar maior proporção do explante que os tecidos vasculares, resultando, provavelmente, em maior

conteúdo de células responsivas e, conseqüentemente na maior freqüência calogênica nos discos foliares retirados da lâmina foliar.

Tabela 2 – Influência do tipo de explante foliar de plantas adultas de *Ginkgo biloba* L. sobre a freqüência (%) de indução de calos, em meio de cultura MS contendo ANA 4,4 µM e BAP 0,4 µM, aos 30 dias de cultivo *in vitro*

Tipo de explante	Freqüência calogênica* (%)
Disco da lâmina foliar	98,0 ± 6,3 a
Disco da base foliar	60,0 ± 14,1 b
Segmento de pecíolo	90,0 ± 23,0 a

Médias ± desvio padrão de 10 repetições de 5 explantes.

Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

*Dados originais transformados em arco sen [raiz(x/100)].

O tipo de explante não influenciou na velocidade com que os calos foram induzidos. As proliferações celulares iniciaram aos 10 dias de cultivo, nas margens dos discos da lâmina foliar (Figura 1D) e dos discos foliares da base da lâmina (Figura 2A), e concomitantemente nas duas extremidades dos segmentos de pecíolos (Figura 2E).

A calogênese em ginkgo foi relatada somente em explantes juvenis, derivados de embriões zigóticos (CAMPER et al., 1997; YU et al., 1999; TOMMASI e SCARAMUZZI, 2004). Nestes tipos de explantes, Yu et al. (1999) observaram que a calogênese foi induzida, em maior freqüência, em explantes de folhas e de pecíolos, comparativamente a embriões e segmentos caulinares e radiculares.

3.3 Efeitos do tipo de auxina e de citocinina na indução de calos em discos foliares

A freqüência calogênica, em discos da lâmina foliar de ginkgo, foi influenciada pela combinação de diferentes auxinas e citocininas no meio de cultura. A maior freqüência de explantes com formação de calos (96%), foi observada quando a combinação de ANA 4,4 µM e BAP 0,4 µM foi utilizada, sendo que entre os demais tratamentos não houve diferença estatística (Tabela 3).

O 2,4-D, independentemente da combinação com as citocininas BAP ou KIN, induziu a formação de calos pequenos, geralmente restritos às margens dos discos foliares (Figura 2C). Estes calos apresentaram altos índices de oxidação (Figura 2D), quando subcultivados nas mesmas condições em que foram induzidos, e não sobreviveram após 3 subcultivos.

Tabela 3 – Efeitos do tipo de auxina e citocinina no meio de cultura MS, sobre a frequência (%) de discos foliares de plantas adultas de *Ginkgo biloba* L. com formação de calos, aos 30 dias de cultivo *in vitro*

Reguladores de crescimento (µM)	Frequência calogênica* (%)
ANA 4,4 + BAP 0,4	96,0 ± 8,9 a
ANA 4,4 + KIN 0,4	64,0 ± 8,9 b
2,4-D 4,4 + BAP 0,4	56,0 ± 16,7 b
2,4-D 4,4 + KIN 0,4	52,0 ± 10,9 b

Médias ± desvio padrão de 5 repetições de 5 explantes.

Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

*Dados originais transformados em arco sen [raiz(x/100)].

Em ginkgo, a melhor combinação entre auxinas e citocininas no meio de cultura, para a indução e crescimento de calos, varia em função do tipo de explante utilizado. Em experimentos realizados por Tommasi e Scaramuzzi (2004), com ápices caulinares de plântulas, a presença de ANA 0,54 µM, em combinação com BAP 4,4 µM ou 8,8 µM, ou com KIN 4,6 µM, resultou na formação de calos maiores, quando comparados aos induzidos com AIA 5,7 µM ou 11,4 µM, em combinação com BAP ou KIN nas mesmas concentrações.

Em cotilédones de embriões imaturos de ginkgo, a calogênese foi induzida com 2,4-D, e com as combinações de ZEA e 2,4-D, e ZEA e ANA, sendo que a combinação entre BA e ANA não induziu a formação de calos nestes explantes (CHOI et al., 2003/2004). Em explantes foliares de plântulas de ginkgo germinadas *in vitro*, a melhor combinação entre reguladores de crescimento para a produção de calos foi observada com ANA 5,4 µM e KIN 0,46 µM (YU et al., 1999).

Camper et al. (1997), observaram que 100% dos explantes cotiledonares formaram calos, independentemente da concentração e combinação entre as auxinas ANA ou 2,4 D com as citocininas KIN ou BA,

porém, o maior crescimento dos calos, em relação à massa fresca foi observado com a combinação de ANA 16,1 μM e BA 4,4 μM . Em embriões, no entanto, o tipo e a concentração de auxina, combinada com citocinina, influenciaram na freqüência de explantes com formação de calos, sendo que maior massa fresca dos calos foi obtida com a combinação de 4,5 μM de 2,4-D e 4,7 μM de KIN (CAMPER et al., 1997).

3.4 Efeitos de diferentes carboidratos no desenvolvimento de calos

O desenvolvimento dos calos foi influenciado pelo tipo de carboidrato utilizado no meio de cultura. Após três subcultivos, a sacarose foi o carboidrato que proporcionou maior massa fresca de calos (394,57 mg), enquanto que a maltose a menor (193 mg), (Tabela 4).

A avaliação do comportamento das taxas de crescimento, indica que a sacarose, além de proporcionar maior crescimento médio dos calos, foi o único carboidrato capaz de manter a produção de massa fresca em taxas crescentes, durante os 3 subcultivos (Tabela 4). As taxas decrescentes de produção de massa fresca dos calos cultivados na presença de glicose + frutose, galactose e maltose, sugerem que estes carboidratos provocam efeitos tóxicos cumulativos nos calos de ginkgo.

Tabela 4 – Efeitos do tipo de carboidrato no crescimento *in vitro* de calos de *Ginkgo biloba* L, em três subcultivos, no meio de cultura MS contendo ANA 4,4 μM e BAP 0,4 μM

Carboidrato (87,6 mM)	Massa fresca (mg)*	Taxa de crescimento Subcultivo**		
		1º	2º	3º
Sacarose	394,57 \pm 33,34 a	1,89	1,99	2,03
Glicose+Frutose	314,15 \pm 37,70 b	1,66	1,54	1,50
Maltose	193,00 \pm 17,18 c	1,03	0,97	0,89
Galactose	202,41 \pm 9,74 d	1,95	0,99	0,96

Médias de 3 subcultivos \pm desvio padrão de 6 repetições de 4 calos.

Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

*Dados originais transformados em $\log(x)$.

**Cada subcultivo compreende um período de 21 dias.

O tipo de carboidrato influencia na formação de calos e nos processos morfogênicos induzidos em explantes de diferentes espécies, quando

cultivados *in vitro*. Os carboidratos fornecem energia e esqueletos carbônicos para a biossíntese de compostos necessários ao crescimento celular *in vitro*, e atuam como componente osmótico do meio de cultura (CALDAS et al., 1998).

Entre os diferentes carboidratos utilizados na cultura de tecidos, a sacarose tem sido o mais utilizado na indução e crescimento de calos de ginkgo (CAMPER et al, 1997; YU et al., 1999, 2004; KANG et al., 2006) e no cultivo de várias espécies, por proporcionar as mais altas taxas de crescimento (CALDAS et al., 1998; PETERSEN et al., 1999), basicamente pela maior eficiência no seu transporte através das membranas (BORKOWSKA e SZEZEBRA, 1991).

Maiores freqüências organogênicas, em explantes de urucum, foram observadas com a utilização de sacarose ou glicose no meio de cultura, quando comparadas com a frutose ou maltose (PAIVA NETO et al., 2003). Em explantes cotiledonares de tomate, no entanto, a maltose induziu maior freqüência organogênica, quando comparada à glicose, frutose e maltose (EL-BAKRY, 2002).

3.5 Efeito do regime luminoso no desenvolvimento de calos

Da mesma forma que o tipo de carboidrato, também o regime de luz, fornecido durante o cultivo *in vitro*, influenciou no desenvolvimento de calos de ginkgo.

A maior produção média de massa fresca (678,3 mg) foi obtida com a manutenção dos calos por 63 dias na ausência de luz, sendo que nesta condição as taxas de crescimento se mantiveram positivas ao longo dos três subcultivos. Por sua vez, o aumento do período de exposição dos calos à luz, foi acompanhado pela redução na produção de massa fresca (Tabela 5). Desta forma, a luz provocou efeitos negativos no desenvolvimento dos calos de ginkgo.

Tabela 5 – Efeitos da luz no desenvolvimento de calos de *Ginkgo biloba* L, em três subcultivos (63 dias), no meio de cultura MS contendo ANA 4,4 µM e BAP 0,4 µM

Período de Escuro/luz (dias)	Massa Fresca (mg)*	Taxa de crescimento Subcultivo**		
		1º	2º	3º
63 / 0	678,3 ± 16,42 a	3,13	3,48	3,57
42 / 21	491,5 ± 12,04 b	3,11	2,24	2,01
0 / 63	389,8 ± 14,34 c	1,83	1,95	2,06

Médias de 3 subcultivos ± desvio padrão de 5 repetições de 5 calos.

Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

*Dados originais transformados em $\log(x)$.

**Cada subcultivo compreende um período de 21 dias.

Taxas decrescentes de produção de massa fresca foram observadas quando os calos foram cultivados inicialmente no escuro, por 42 dias, e depois transferidos para a luz por mais 21 dias (Tabela 5).

3.6 Análise morfológica e histológica dos calos produzidos a partir de explantes foliares

A análise morfológica dos calos induzidos em explantes foliares de ginkgo revela que, calos primários, induzidos diretamente sobre os explantes foliares, no período de 30 dias, apresentaram o mesmo padrão de coloração e estrutura. No entanto, quando subcultivados na presença de citocinina, apresentaram mudanças no padrão morfológico.

Calos primários, branco-amarelados e de estrutura friável foram formados nos discos da lâmina foliar (Figura 1D, E, F), discos da base da folha com parte do pecíolo (Figura 2A, B), e nos segmentos de pecíolos (Figura 2E, F), cultivados por 30 dias em meio MS adicionado de ANA, ou com as combinações entre ANA e BAP, ANA e KIN, 2,4D e BAP, e 2,4D e KIN.

Quando os calos primários, branco-amarelados e friáveis, induzidos no meio de cultura contendo ANA 4,4 µM e BAP 0,4 µM, foram subcultivados por 63 dias neste mesmo meio de indução, adquiriram coloração esverdeada e estrutura compacta. Não foram observadas alterações neste padrão de cor e estrutura quando os calos foram subcultivados com diferentes regimes de luz ou diferentes carboidratos. A presença de luz durante os 3 subcultivos, e

os tipos de carboidratos utilizados no meio de cultura, influenciaram apenas no crescimento dos calos, e não na sua morfologia. No entanto, a presença de luz durante todo o período de cultivo dos calos, parece ter intensificado a coloração esverdeada dos calos. Estes calos de coloração esverdeada e estrutura compacta foram aqui denominados e classificados como calos do tipo 1 (Figura 3A).

Considerando que as condições de cultivo permaneceram as mesmas durante a fase de indução e desenvolvimento destes calos, as mudanças na sua cor e estrutura podem ser atribuídas à presença contínua da citocinina BAP no meio de cultura durante os três subcultivos.

Calos primários, induzidos na presença isolada de ANA, nas diferentes concentrações, apresentaram coloração branco-amarelada e estrutura friável, mesmo quando subcultivados neste mesmo meio de indução, e foram classificados como tipo 2 (Figura 3B). Quando estes calos foram subcultivados em meio de cultura contendo ANA 4,4 μM e BAP 0,4 μM , também adquiriram a coloração esverdeada e estrutura compacta.

A influência dos reguladores de crescimento, da luz e do carboidrato no desenvolvimento e na morfologia de calos, foi investigada em diferentes espécies. Cotilédones de embriões imaturos de ginkgo, cultivados em meio MS, com combinações de ZEA e 2,4D ou ANA, ou na presença isolada de 2,4D, desenvolveram calos compactos de cor verde escuro (CHOI et al., 2003/2004). A presença de luz durante o cultivo *in vitro* de explantes foliares de *Cuphea ericoides* e *Cuphea ingrata* (IMACULADA, 1991), e 'Orange mint' (VAN ECK e KITTO, 1992), induziu a formação de calos de estrutura mais compacta, quando comparados aos calos formados no escuro. A presença de ANA no meio de cultivo induziu a formação de calos friáveis em discos foliares de *Capraria biflora* (BRITO et al., 1995).

A coloração apresentada pelos calos pode ser influenciada por diferentes fatores, como a presença de citocinina e de carboidrato no meio de cultura. A síntese de clorofila e o desenvolvimento dos cloroplastos em calos podem ser estimulados pela citocinina e pelo tipo de carboidrato. Quando os calos são cultivados na presença de luz, a coloração verde pode ser intensificada (CRECHE et al., 1994).

As análises histológicas dos explantes foliares de ginkgo indicam que houve intensa atividade de divisão celular em tecidos epidérmicos e subepidérmicos, culminando na formação de calos primários em discos foliares (Figura 3C), discos da base foliar, com parte de pecíolo (Figura 3D) e segmentos de pecíolos (Figura 3E). Nos calos primários e naqueles subcultivados em diferentes condições de luz, carboidratos ou reguladores de crescimento, não foram observadas estruturas organizadas que resultassem na expressão de vias morfogênicas durante o período de cultivo (Figura 3F).

3.7 Avaliação da produção de metabólitos secundários em calos e folhas

As análises do perfil químico dos extratos das folhas de plantas adultas de *Ginkgo*, de folhas produzidas *in vitro* e dos calos cultivados em meio de cultura contendo a combinação de ANA 4,4 μM e BAP 0,4 μM (calo tipo 1) ou ANA 4,4 μM (calo tipo 2), na presença e ausência de luz, revelaram, através do método de TLC, a existência de substâncias com comportamento cromatográfico semelhante ao das substâncias de referência (ginkgolídeos A e B, quercetina, camferol e rutina). Contudo, as análises realizadas nestes extratos, pelo método de HPLC, não confirmaram a presença destes compostos (Figura 4).

Diferentes fatores, relacionados aos explantes e condições de cultivo e aos métodos de extração e análise, podem ter contribuído para a não produção, ou não detecção destes metabólitos nos extratos de *Ginkgo*. Dentre os fatores podem ser citados o tipo e concentração dos reguladores de crescimento, utilizados na indução e manutenção dos calos, as condições ambientais de cultivo dos calos e a idade das plantas das quais as folhas foram retiradas.

Estudos relacionados à produção de terpenóides e flavonóides glicosilados em *Ginkgo* (CAMPER et al., 1997; BALZ et al., 1999; YU et al., 1999, 2004; DUPRÉ et al., 2000; KANG et al., 2006), relatam resultados bastante contraditórios em relação ao conteúdo destes compostos nos diferentes tipos de culturas, tanto de plantas cultivadas a campo, como em

culturas mantidas *in vitro*. Alguns destes trabalhos mencionam conteúdos de terpenos da ordem de 100 ng.g^{-1} até $1 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$, às vezes abaixo do limite de detecção de certos equipamentos utilizados para as análises.

Balz et al. (1999) quantificaram os terpenóides em culturas celulares e em diferentes explantes de plantas de *Ginkgo*, em idades variadas. Verificaram que, em extratos de culturas celulares, o conteúdo total de terpenóides foi em torno de $1 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$, enquanto que em cultura de raízes foi de 4 mg.g^{-1} ; o mesmo conteúdo encontrado em folhas de plantas jovens de *Ginkgo*. Em culturas de calos de raízes de plântulas de *Ginkgo*, o conteúdo de ginkgolídeos variou de 0,005% a 0,01%, sendo um dos melhores resultados já relatados (YU et al., 1999).

A produção de metabólitos secundários, como os terpenóides e os flavonóides glicosilados de *Ginkgo*, em plantas cultivadas a campo e em culturas celulares *in vitro*, é considerada bastante variada, e diferentes fatores podem estar envolvidos na síntese destes compostos (BALZ et al., 1999; DUPRÉ et al., 2000). O estudo realizado por Balz et al. (1999), revela não haver correlação entre conteúdo de terpenos nas folhas com o sexo da planta, ou com as condições de cultivo como composição do meio de cultura, luz e reguladores de crescimento. No entanto, a idade da árvore é o fator que mais influencia, sendo que os conteúdos de flavonóides e terpenóides em *Ginkgo*, decrescem acentuadamente nas folhas com o avanço da idade da planta.

O tipo e concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura influenciam a síntese e o acúmulo de terpenóides em certas culturas celulares de *Ginkgo*. Calos de cotilédones e de embriões zigóticos acumularam mais ginkgolídeos na presença de 2,4-D do que quando cultivados com ANA (CAMPER et al., 1997). O 2,4-D, em concentrações de até 8 mg.L^{-1} , foi responsável pelo aumento no conteúdo de ginkgolídeos em culturas de calos de *Ginkgo*, porém, qualquer aumento além desta concentração da auxina, provocou diminuição no conteúdo dos terpenóides nos calos (YU et al., 1999). A otimização do meio de cultura para a produção de terpenos nestes calos, foi obtida com a mistura de 2,4-D 8 mg.L^{-1} + KIN $0,04 \text{ mg.L}^{-1}$ + ANA $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ (YU et al., 2004).

O metil-jasmonato e o ácido salicílico, adicionados ao meio de cultura, incrementaram o conteúdo de ginkgolídeos e de bilobalídeo em culturas celulares de *Ginkgo*, ao mesmo tempo em que inibiram o crescimento celular (KANG et al., 2006).

A síntese de metabólitos secundários ocorre, geralmente, em detrimento da produção de metabólitos primários, afetando o crescimento das culturas (ROBERT et al., 1991). Desta forma, culturas em fase de crescimento ativo, em que a condição de máxima produção de massa celular é priorizada, podem apresentar menores conteúdos de metabólitos secundários quando comparadas às culturas mantidas em condições que favoreçam ao metabolismo secundário. Este é outro fator que pode ter influenciado na produção de ginkgolídeos A e B, Quercetina, Camferol e Rutina nos calos de ginkgo avaliados neste trabalho.

Os compostos investigados também não foram detectados nas folhas de plantas adultas e naquela produzidas *in vitro*, levando a crer que também a metodologia utilizada na extração e avaliação dos compostos, não foi adequada. Segundo Gray et al. (2006), dependendo das condições adotadas nos processos de extração e análise, muitos compostos, principalmente aqueles que são sintetizados em quantidades muito pequenas, como os ginkgolídeos e o bilobalídeo, podem não ser detectados. Segundo Balz et al. (1999), a falta de cromóforos fortes nas lactonas terpênicas dificulta a sua determinação por U.V.

Ainda que as rotas biossintéticas de terpenóides e flavonóides em *Ginkgo*, comprovadamente se expressem em culturas celulares, o conteúdo de metabólitos é considerado ainda muito pequeno para a aplicação industrial. Desta forma, novas abordagens devem ser investigadas, como a tecnologia de transferência de genes (DUPRÉ et al., 2000), ou a utilização de substâncias elicitoras da síntese de metabólitos secundários em culturas celulares (KANG et al., 2006), capazes de oferecer novas oportunidades para o aumento da síntese destes compostos em *Ginkgo*.

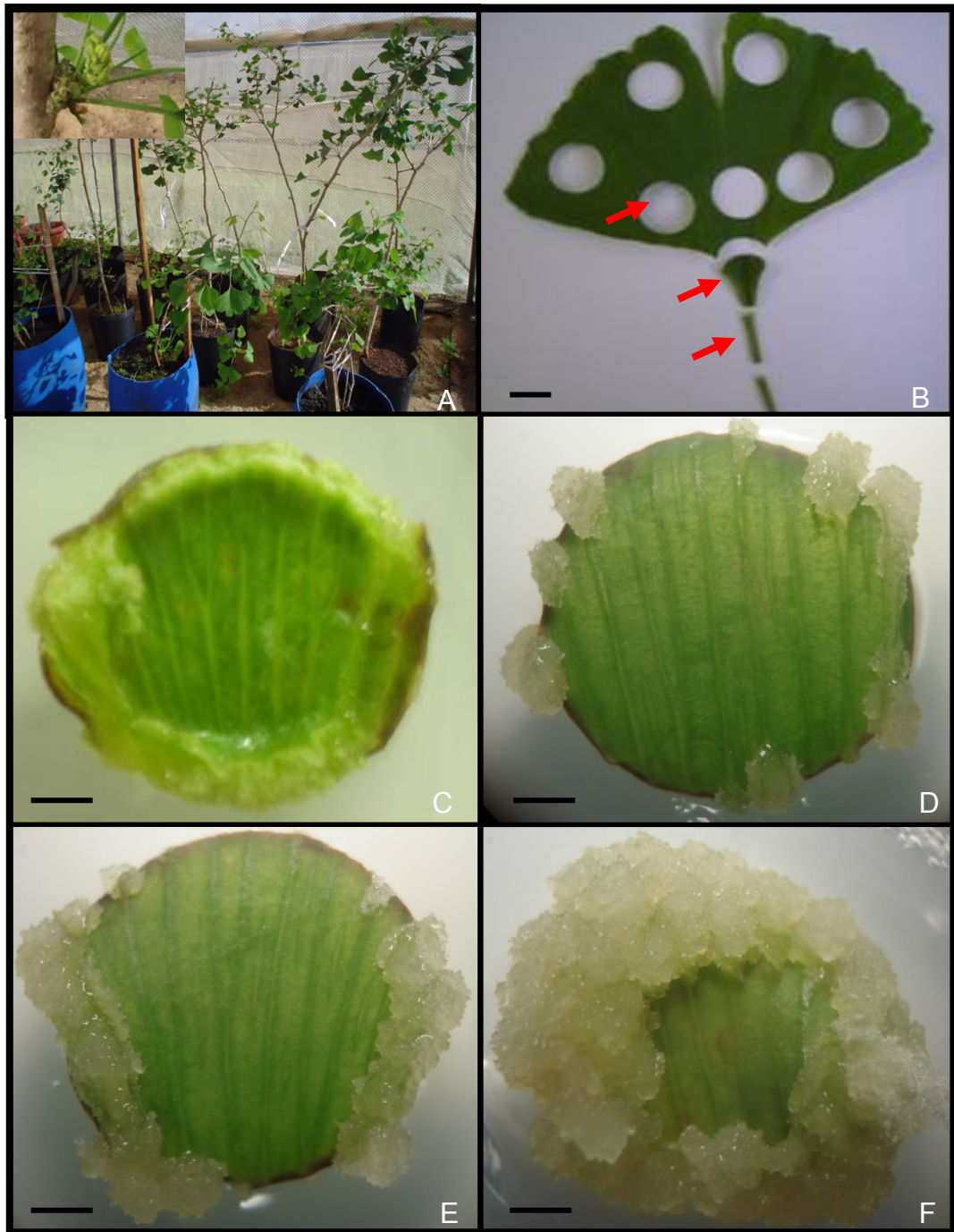


Figura 1 – Matrizes adultas, explantes foliares e calogênese em discos foliares de *Ginkgo biloba* L., cultivados em meio de cultura MS contendo ANA 4,4 μM e BAP 0,4 μM . A – plantas-matrizes fontes de explantes, em casa de vegetação (detalhe do ramo curto e estruturas reprodutivas masculinas); B – folha expandida e tipos de explantes utilizados; C – calo cicatricial, aos 30 dias de cultivo; D – calos primários nas margens, aos 10 dias de cultivo; E – calos primários associados às nervuras, aos 20 dias de cultivo; F – calo primário aos 30 dias de cultivo. Barras: B = 5 mm; C, D, E, F = 1 mm.

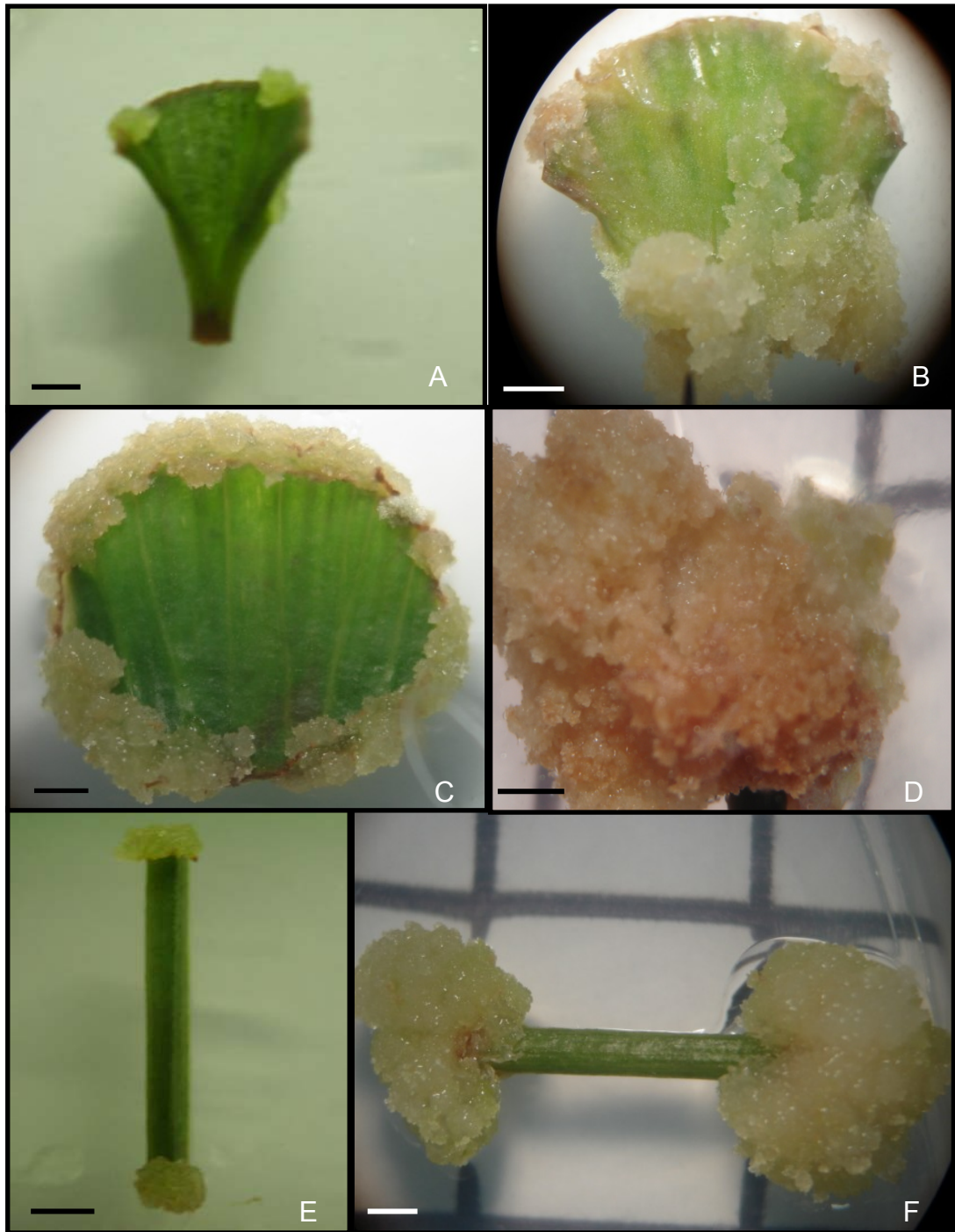


Figura 2 – Calogênese em explantes foliares de plantas adultas de *Ginkgo biloba* L., cultivados em meio de cultura MS contendo ANA 4,4 μ M e BAP 0,4 μ M (A, B, E, F), e com 2,4-D 4,4 μ M e BAP 0,4 μ M (C, D). A – calos primários nas margens de discos basais da folha, aos 10 dias de cultivo; B – calos primários em discos basais da folha, aos 30 dias de cultivo; C – calos primários produzidos na presença de 2,4-D; D – calos subcultivados em 2,4-D; E - calos primários em segmentos de pecíolos, aos 10 dias de cultivo; F – calos primários em segmentos de pecíolos, aos 30 dias de cultivo. Barras = 1 mm.

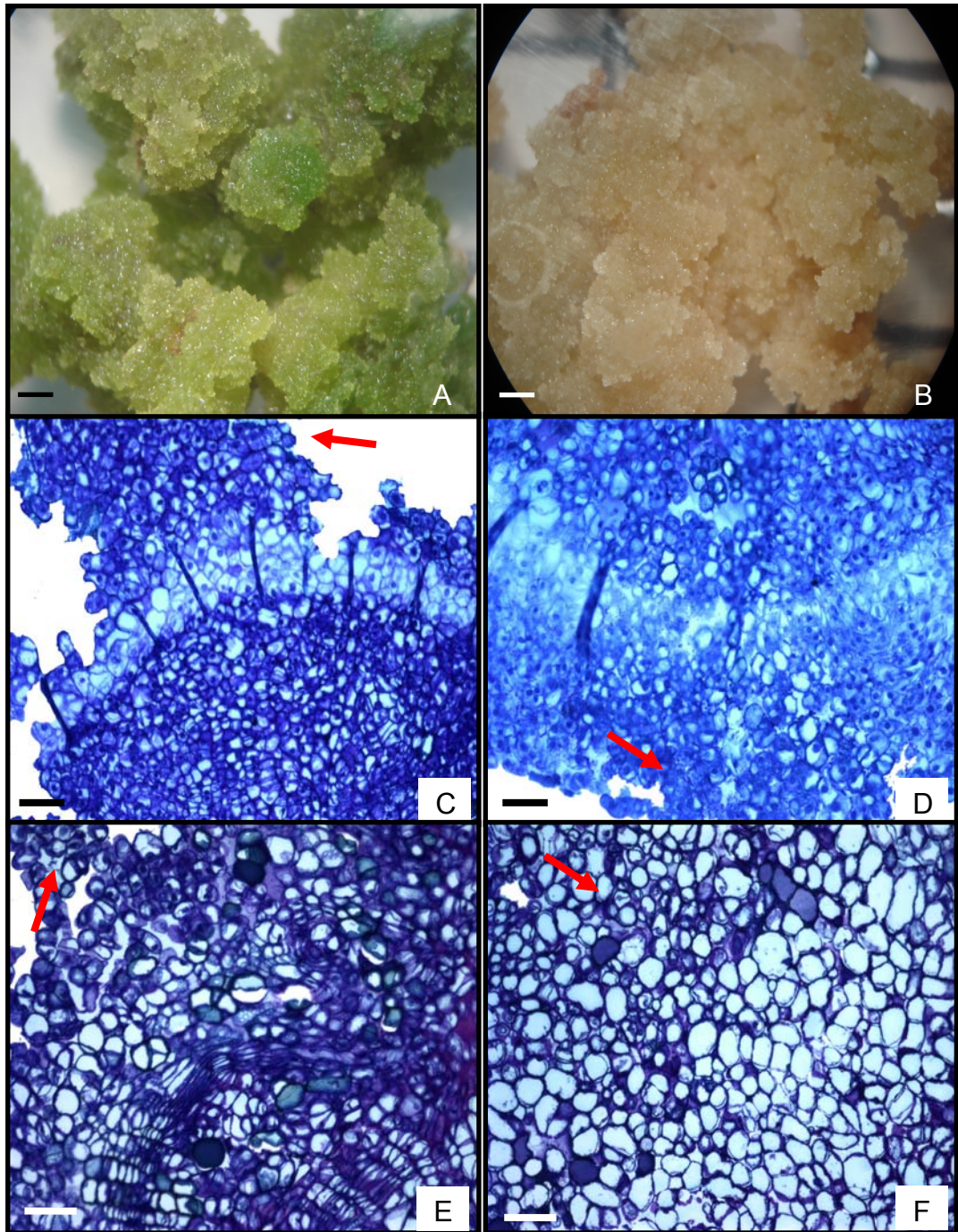


Figura 3 – Calos produzidos a partir de explantes foliares de plantas adultas de *Ginkgo biloba* L., subcultivados em meio de cultura MS. A – calo tipo 1, verde compacto, meio com ANA 4,4 μ M e BAP 0,4 μ M; B – calo tipo 2, branco-amarelado friável, meio com ANA 4,4 μ M. Fotomicrografias de cortes transversais de explantes foliares apresentando proliferações celulares (setas) e formação de calos primários (C, D, E): C – disco foliar; D – disco da base foliar; E – segmento de pecíolo; F – calo tipo 1. Barras: A, B= 1 mm, C, D, E F = 200 μ m.

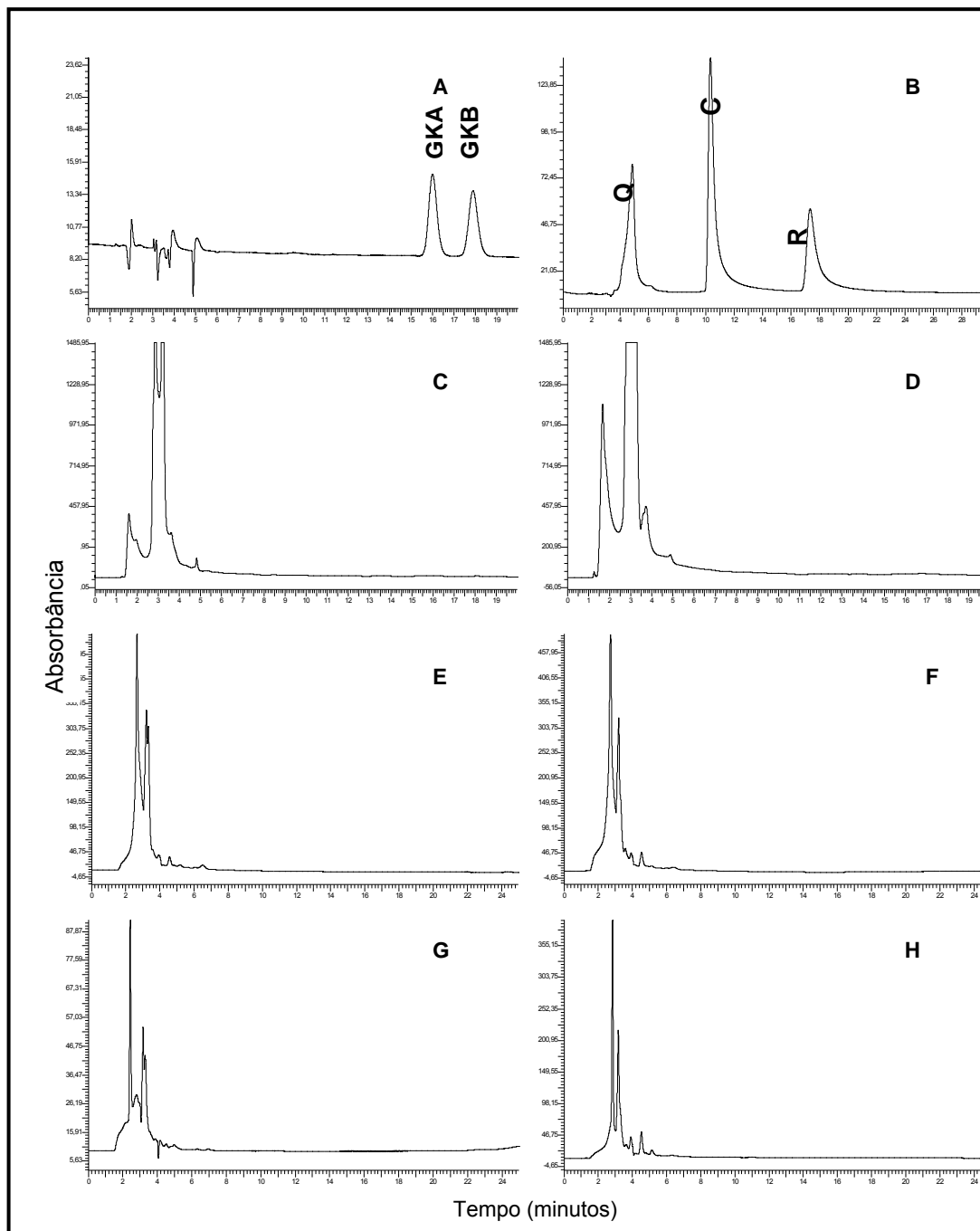


Figura 4 – Cromatogramas comparativos, em HPLC: A - padrões de ginkgolídeos A (GKA) e B (GKB); B – Quercetina (Q), Camferol (C), e Rutina (R); C – extratos de folhas de plantas matrizes; D - extratos de folhas produzidas *in vitro*; Extratos de calos induzidos em explantes foliares cultivados com ANA 4,4 μM e BAP 0,4 μM , na presença de luz (E) e no escuro (F); G - extratos de calos induzidos em explantes foliares cultivados com ANA 44,0 μM , na presença de luz; H - e no escuro. Condições cromatográficas: Fase móvel: Metanol:Água (60:40 v/v); coluna de fase reversa C 18; volume de injeção de 20 μL e fluxo de 0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Detecção 220 nm.

4 CONCLUSÕES

Este é o primeiro relato da produção de calos em explantes foliares de plantas adultas de *Ginkgo biloba* L. A calogênese é influenciada pelas condições de cultivo como combinação entre reguladores de crescimento no meio de cultura, tipo de explante, carboidrato e regime de luz, e dependente de uma fonte exógena de auxina.

Combinações de ANA 4,4 μ M com BAP 0,4 μ M ou 4,4 μ M induzem altas freqüências calogênicas em discos foliares, sendo mais efetivas que combinações de ANA e KIN, 2,4D e BAP, e 2,4D e KIN.

Discos foliares e segmentos de pecíolos são mais responsivos ao meio de indução de calos, do que os discos da base foliar contendo parte do pecíolo.

O cultivo com sacarose e na ausência de luz proporciona a máxima produção de massa fresca de calos.

O BAP, quando utilizado por três subcultivos, altera a morfologia de calos branco amarelados e friáveis para verdes e compactos.

Terpenóides e flavonóides glicosilados não foram detectados nos calos ou folhas de *G. Biloba* por TLC e HPLC.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E. C. S. de C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 421-430, 2004.
- BALZ, J.P.; COURTOIS, D.; DRIEU, J.; DRIEU, K.; REYNOIRD, J.P.; SOHIER, C.; TENG, B.P.; TOUCHÉ, A.; PÉTIARD, V. Production of Ginkgolides and Bilobalide by *Ginkgo biloba* plants and tissue cultures. **Planta Medica**, v. 65, n. 7, p. 620-626. 1999.
- BIRKS, J.; GRIMLEY, E.J.; VAN DONGEN, M. *Ginkgo biloba* for cognitive impairment and dementia. Oxford: Update Software (4): 2002, Aug. 30: 1-53. Available from www.updateusa.com/abs/titlelist.htm
- BORKOWSKA, B.; SZEZEBRA, J. Influence of different carbon sources on invertase-activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 911-915, 1991.
- BRENNER, E.D.; KATARI, M.S.; STEVENSON, D.W.; RUDD, S.S.; DOUGLAS, A.W.; MOSS, W.N.; TWIGG, R.W.; RUNKO, S.; STELLARI, G.M.; McCOMBIE, W.R.; CORUZZI, G.M. EST analysis in *Ginkgo biloba*: an assessment of conserved developmental regulators and gymnosperm specific genes. **BMC Genomics**, V. 6, n. 143, 2005. [<http://biomedcentral.com/1471-2164/6/143>].
- BRITO, A. E. R. M.; COSTA, M. S. da; HANDRO, W. Morphogenesis and plant regeneration in leaf explants and callus tissues of *Capraria biflora* cultured *in vitro*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 7, n. 2, p. 171-174, 1995.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília:Embrapa – SPI/ Embrapa – CNPH, 1998. p. 87-132.
- CAMPER, N.D.; COKER, P.S.; WEDGE, D. E.; KEESE, R. J. *In vitro* culture of *Ginkgo*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 33, p. 125-127, 1997.
- CARRIER, D.J.; CHAURET, N.; MANCINI, M.; COULOMBE, P.; NEUFELD, R.; WEBWER, M.; ARCHAMBAULT, J. Detection of ginkgolide A in *G. biloba* cell cultures. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 256-259, 1991.
- CHOI, P. S.; CHO, D. Y.; SOH, W. Y. Shoot organogenesis from immature zygotic embryo cultures of *Ginkgo biloba*. **Biologia Plantarum**, v. 47, n. 2, p. 309-319, 2003/4.
- CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **HortScience**, v. 23, n. 3, p. 515-519, 1998.
- CRECHE, J.; RIDEAU, M.; LECLERC, J. C. Photosynthesis in callus cultures of *Choisya ternate* (Rutaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 337, p. 9-14, 1994.

CURTIS-PRIOR, P.; VERE, D.; FRAY, P. Therapeutic value of *Ginkgo biloba* in reducing symptoms of decline in mental function. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 535-541, 1999.

DUPRÉ, P.; LACOUX, J.; NEUTELINGS, G.; LAURAIN, D. M.; FLINIAUX, M. A.; DAVID, A.; DUBREUIL, A. J. Genetic transformation of *Ginkgo biloba*, by *Agrobacterium tumefaciens*. **Physiologia Plantarum**, v. 108, n. 4, p. 413-419. 2000

EL-BAKRY, A. A. Effect of genotype, growth regulators, carbon source, and pH on shoot induction and plant regeneration in tomato. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 38, p. 501-507, 2002.

GIFFORD, E.M.; FOSTER, A.S. **Morphology and evolution of vascular plants**. New York: W.H. Freeman and Company, 1989.

GRAY, D. E.; UPTON, R.; CHANDRA, A.; PORTER, A.; HARRIS, R. K. Quantitative analysis of flavonol glycosides in *Ginkgo biloba*: a comparison of two analytical methods. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p. 56-62, 2006.

IMACULADA, I. R. **Estudo da morfogênese in vitro em tecidos de *Cuphea ingrata* Cham. & Schlechtd e *Cuphea ericoides* Cham. & Schlechtd**. 1991. 155 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1991.

KANG, S. M.; MIN, J.Y.; KIM, Y. D.; KANG, Y. M.; PARK, D. J.; JUNG, H. N.; KIM, S. W.; CHOI, M. S. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of bilobalide and ginkgolides in cell cultures of *Ginkgo biloba*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 42, p. 44-49, 2006.

MANTOVANI, N. C. **Estudo da regeneração in vitro de caixeta *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. Et Planch**. 1997. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 1997.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H. Respostas morfogênicas em explantes foliares de caixeta (*Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. Et Planch. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 6, n. 3, p. 269-272, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NERARTAVIS, E. G.; MIRANDA, R. M. Indução de calogênese *in vitro* de cajuzeiro *Anacardium occidentale* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5, 1995, Lavras. **Anais...Lavras**, 1995, p.140.

PAIVA NETO, V.B.; MOTA, T.,R.; OTONI, W.C. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, n. 4, p. 32-38, 2003.

PETERSEN, K. K.; HANSEN, J.; KROGSTRUP, P. Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of *Miscanthus X ogiformis* Honda "Giganteus". **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 58, p. 189-197, 1999.

ROBERT, M. L.; REYES, J.; LOYOLA, V. M. Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas *in vitro*. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali, Colombia: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1991. cap. 9, p. 211-235.

SOHIER, C.; COURTOIS, D. *Ginkgo biloba* and production of secondary metabolites. In: KAYSER, O.; QUAX, W.J. (Eds.). **Medicinal plant biotechnology: from basic research to industrial applications**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, 2007. p. 493-514

TOMMASI, F.; SCARAMUZZI, F. *In vitro* propagation of *Ginkgo biloba* by using various bud cultures. **Biologia Plantarum**, v. 48, n. 2, p. 297-300, 2004.

VAN BEEK, T. A. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. **Journal of Chromatography**, v. 937, p. 21-55, 2002.

VAN ECK, J. M. ; KITTO, S. L. Regeneration of *Pepper mint* and *Orange mint* from leaf disks. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 30, p. 41-49, 1992.

YU, R.; ZHAO, H.; ZHENG, Y.; YAO, X.; ZHANG, H. Studies on the callus cultures of *Ginkgo biloba* and its metabolites-Ginkgolides. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 15, n.1, p. 51-58, 1999.

YU, R. M.; GAO, Y.; SONG, L. Y.; ZHANG, D. Z.; YE, W. C.; YAO, X.S. The immobilized cells cultures of *Ginkgo biloba* and the production of ginkgolides. **Acta Botanica Yunnanica**, v. 26, n. 3, p. 338-344, 2004.

WAREING, P. F.; AL-CHALABI, T. Determination in plant cells. **Biologia Plantarum**, v. 27, p. 241-248, 1985.

INDUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE BRODOS AXILARES EM EXPLANTES NODAIS DE PLANTAS ADULTAS DE *Ginkgo biloba* L.

RESUMO

Neste trabalho foi avaliado o comportamento de segmentos nodais de plantas adultas, visando estabelecer um sistema de propagação *in vitro* de *G. biloba*, a partir de brotos axilares, e a comparação do padrão de desenvolvimento dos brotos *in vitro* com o observado *in vivo*. Segmentos nodais lenhosos não emitiram brotos axilares e apresentaram 100% de contaminação fúngica e bacteriana depois do processo de desinfestação superficial. Segmentos nodais de ramos herbáceos foram desinfestados com sucesso e apresentaram alta capacidade regenerativa *in vitro*. A caseína hidrolisada (CH 500 mg.L⁻¹) foi essencial para a indução de brotos axilares e também para a multiplicação destes brotos em meio de cultura MS. Na presença da CH, na fase de isolamento, 85% dos segmentos nodais emitiram brotos, e em 35%, múltiplos brotos foram formados, enquanto que na fase de multiplicação, 66,6% dos propágulos multiplicaram, e 33,3% formaram múltiplos brotos. A cinetina (KIN 0,46 e 4,65 µM) e o carvão ativado (CA 1,5 g.L⁻¹) apresentaram efeitos inibitórios neste processo. Existem dois padrões distintos de desenvolvimento de brotos *in vitro*, à semelhança do que ocorre *in vivo*. Brotos curtos, com segmentos internodais muito próximos, expansão de algumas folhas e de crescimento lento, e brotos longos, distintos por nós separados por segmentos longos, e com maior crescimento apical. Este é o primeiro relato da formação de múltiplos brotos em segmentos nodais de plantas adultas de *Ginkgo biloba* L.

Palavras-chave: segmentos nodais, caseína hidrolisada, carvão ativado, cinetina, múltiplos brotos.

1 INTRODUÇÃO

Ginkgo biloba L. é uma gimnosperma arbórea originária da China, o único membro vivo de um dos mais antigos grupos de plantas com sementes, com uma longa história de uso na medicina, e também, cultivada como planta ornamental em diferentes países (GIFFORD e FOSTER, 1989; BRENNER et al., 2005).

Os principais metabólitos sintetizados pelo ginkgo, com ação medicinal, são as lactonas terpênicas (ginkgolídeos e bilobalídeo), exclusivos desta espécie, e os glicosídeos flavonóides (VAN BEEK, 2002), acumulados principalmente nas folhas, e também detectados em plantas regeneradas *in vitro* e em culturas celulares (CARRIER et al., 1991; CAMPER et al., 1997; BALZ et al., 1999; YU et al., 1999, 2004; KANG et al., 2006; GRAY et al., 2006; SOHIER e COURTOIS, 2007).

Extratos padronizados, produzidos principalmente a partir de folhas de ginkgo, são comercializados no mundo todo, e somente nos Estados Unidos e na Europa, bilhões de doses foram comercializadas em duas décadas (GRAY et al., 2006). Contudo, apenas os Estados Unidos e a França, cultivam o ginkgo em larga escala para fins industriais (CAMPER et al., 1997).

A propagação do ginkgo a partir de sementes encontra dificuldades devido à dioicidia da espécie e à longa fase juvenil (MONTEZ-LOPEZ e RODRIGUEZ, 2001), à baixa taxa de germinação e ao curto período de viabilidade das sementes (TOMMASI e SCARAMUZZI, 2004). A propagação vegetativa, através da estaquia, apresenta baixo rendimento, sendo extremamente dependente da natureza juvenil dos explantes (MONTEZ-LOPEZ e RODRIGUEZ, 2001; SEXTO, 2005).

A propagação *in vitro* do ginkgo, a partir de diferentes rotas morfogênicas, foi relatada exclusivamente em explantes obtidos de embriões zigótico e de plântulas germinadas *in vitro* (LAURAIN et al., 1996; HAO et al., 2000; MONTES-LÓPEZ e RODRÍGUEZ, 2001; HU et al., 2002; TOMMAZI e SCARAMUZZI, 2004, CHOI et al., 2003/4). Na literatura existem dois relatos sobre cultivo de segmentos nodais e ápices caulinares de plantas adultas, com o objetivo de propagação *in vitro* de ginkgo, porém sem sucesso na

regeneração de plantas completas (MONTES-LÓPEZ e RODRÍGUEZ, 2001; TOMMAZI e SCARAMUZZI, 2004).

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram avaliar o comportamento de segmentos nodais obtidos de plantas adultas de *Ginkgo biloba* L., visando à multiplicação *in vitro* de brotos, e a comparação do padrão de desenvolvimento destes brotos *in vitro* com o observado *in vivo*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAMV, da Universidade de Passo Fundo – UPF, RS, no período de março de 2005 a março de 2007.

2.1 Material vegetal, obtenção e desinfestação dos explantes

Plantas-matrizes de *Ginkgo biloba*, produzidas a partir de estacas, com aproximadamente 5 anos de idade e em estágio reprodutivo, foram utilizadas como fontes de explantes.

As plantas matrizes foram cultivadas em casa de vegetação, sob tratamentos fitossanitários e nutricionais, realizados mediante pulverizações semanais intercaladas de soluções de fungicidas sistêmico e de contato, e adubações quinzenais com solução nutritiva da formulação Ouro Verde (Takenaka S.A. Indústria e Comércio), via água de irrigação, diretamente no substrato.

Foram utilizados como explantes segmentos nodais de 20 mm de comprimento excisados das plantas matrizes. Testou-se segmentos nodais de ramos lenhosos, de mais de um ano, coletados no inverno (mês de junho), e segmentos nodais de ramos herbáceos, de dois meses, coletados no verão (janeiro).

Para a desinfestação superficial dos explantes, seguiu-se a metodologia descrita por Mantovani et al. (2006), que consiste na imersão dos segmentos nodais em solução contendo os fungicidas Benomil a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ e Captan a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, por 20 minutos, e em condições assépticas, nas soluções de álcool 70% por 30 segundos, e por 7 minutos na solução de água sanitária 25% (com 2,5% de cloro ativo e pH 6,5) acrescida de Tween-20 0,1%.

Após a desinfestação os explantes foram enxaguados por três vezes com água destilada e autoclavada, e inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura.

2.2 Indução de crescimento de gemas axilares e multiplicação de brotos

A indução de crescimento de gemas axilares em segmentos nodais, e a multiplicação destes brotos, foram realizadas em duas etapas em que foram avaliados os efeitos da caseína hidrolisada (CH) a 500 mg.L^{-1} , da cinetina (KIN; 6-furfurilaminopurina) a $0,46 \text{ }\mu\text{M}$ e $4,65 \text{ }\mu\text{M}$, e do carvão ativado (CA) a $1,5 \text{ g.L}^{-1}$, conforme os seguintes tratamentos: T1 – Controle (MS; MURASHIGE e SKOOG, 1962); T2 – MS + CH; T3 - MS + CH + KIN $0,46 \text{ }\mu\text{M}$; T4 - MS + CH + KIN $4,65 \text{ }\mu\text{M}$; T5 – MS + CH + CA; T6 - MS + CH + KIN $0,46 \text{ }\mu\text{M}$ + CA; T7 - MS + CH + KIN $4,65 \text{ }\mu\text{M}$ + CA.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. O experimento de isolamento e indução de crescimento de gemas axilares foi constituído de 5 repetições (tubos de ensaio) por tratamento, com 4 tubos por repetição, e um explante por tubo. O experimento de multiplicação foi constituído de 4 repetições (frascos de cultura de 240 mL) por tratamento, com 3 frascos por repetição e um broto por frasco.

Após 30 dias de cultivo, foram avaliadas as freqüências de explantes respondentes com formação de brotos e múltiplos brotos. O padrão de desenvolvimento dos brotos produzidos *in vitro* foi comparado com o observado *in vivo*, nas plantas matrizes.

2.3 Meio de cultura e condições ambientais utilizadas durante o cultivo *in vitro*

O meio de cultura utilizado foi o MS, adicionado de 100 mg.L^{-1} de mio-inositol, $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar (Merck), e $87,6 \text{ mM}$ de sacarose, com pH ajustado em $5,7 \pm 0,1$, com NaOH ou HCl $0,1 \text{ N}$, após a adição dos reguladores de crescimento.

O meio de cultura foi distribuído em alíquotas de 10 mL, em tubos de ensaio (150mm x 25 mm), e 50 mL em frascos de cultura (240 mL). Os recipientes foram vedados com tampas plásticas e autoclavados por 15 minutos, à temperatura de 121°C .

As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas, com intensidade luminosa aproximada de $36 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil), e temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Para o experimento de indução de crescimento de gemas axilares, os tubos de ensaio permaneceram no escuro nos 7 primeiros dias.

2.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através da ANOVA (análise da variância), aplicando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade, para a comparação das médias dos tratamentos, utilizando-se o programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas - Universidade Federal de Viçosa).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento de segmentos nodais e indução de crescimento de gemas axilares

A manutenção das plantas matrizes de ginkgo em casa de vegetação (Figura 1A), sob tratamentos fitossanitários e nutricionais, possibilitou o desenvolvimento de ramos em condições adequadas para a obtenção dos explantes. Nestas plantas podem ser observados os brotos curtos (Figura 1B, C) e longos (Figura 1C), emitidos durante a estação de crescimento, as folhas bilobadas características da espécie (Figura 1C), e estruturas portadoras de microesporângios, em diferentes estádios de desenvolvimento, produzidas em ramos curtos (Figura 1D, E, F, G).

A estação do ano em que os explantes de ginkgo foram excisados das plantas matrizes influenciou no estabelecimento e na capacidade regenerativa *in vitro*. Segmentos nodais de ramos lenhosos, com mais de um ano de idade, excisados no mês de junho (inverno), período em que as plantas não contêm folhas, apresentaram 100% de contaminação fúngica e bacteriana, mesmo após o processo de desinfestação superficial. Neste tipo de explante (Figura 1H), a periderme se apresenta de forma fibrosa, e as brácteas imbricadas, que protegem as gemas caulinares neste período, permitem o acúmulo de microorganismos contaminantes, dificultando a efetiva penetração e ação dos agentes desinfestantes utilizados no processo de desinfestação. Desta forma, a metodologia utilizada não foi eficiente para a desinfestação superficial destes explantes, impossibilitando seu estabelecimento *in vitro*.

Durante o período de cultivo dos segmentos nodais lenhosos, não houve formação de brotos a partir das gemas axilares. Comportamento semelhante, em relação à contaminação e ausência de regeneração, deste tipo de explante foi verificado por Sexto (2005).

Segmentos nodais de ramos herbáceos (Figura 1I), de 2 meses, excisados no mês de janeiro (verão), período de crescimento ativo da planta, foram desinfestados e estabelecidos com sucesso *in vitro*. A contaminação, especialmente por fungos (Figura 1J), ocorreu em 7% dos segmentos nodais

cultivados, enquanto que a necrose (Figura 1K) foi observada em 3% dos explantes, principalmente na região axilar, após o processo de desinfestação. MANTOVANI et al. (2006) observaram que segmentos nodais de ginkgo eram desinfestados com maior facilidade quando coletados de ramos produzidos no ano, além de apresentarem maior capacidade regenerativa *in vitro*, quando comparados aos segmentos nodais coletados de ramos lenhosos. MONTES-LÓPEZ e RODRÍGUEZ (2001) observaram que explantes excisados da posição apical respondiam melhor ao processo de desinfestação do que segmentos nodais coletados de posições basais nos ramos de ginkgo.

O potencial regenerativo dos explantes herbáceos, durante os 30 dias de cultivo *in vitro*, na fase de isolamento, foi influenciado pela presença da caseína hidrolisada, da citocinina e do CA no meio de cultura.

Em meio de cultura MS (controle), 80% dos segmentos nodais apresentaram gemas axilares intumescidas, porém, apesar de indicarem início de crescimento, não formaram brotos (Tabela 1).

A caseína hidrolisada (CH) foi essencial para o desenvolvimento das gemas axilares e, para a formação de múltiplos brotos nos segmentos nodais de ginkgo. Os melhores resultados foram obtidos no meio MS, adicionado de CH 500 mg.L⁻¹, em que 85% dos segmentos nodais apresentaram gemas axilares intumescidas, que se desenvolveram formando brotos, e 35% formaram múltiplos brotos (Tabela 1).

Diferentes estádios de desenvolvimento dos brotos, a partir de gemas axilares de segmentos nodais, cultivados em meio de cultura MS suplementado com CH 500 mg.L⁻¹, podem ser visualizados na Figura 2. Aos 10 dias de cultivo, é possível visualizar a gema axilar ainda parcialmente envolvida por brácteas (Figura 2A). Aos 15 e 20 dias, em estádios mais avançados, ocorre a abertura das brácteas (Figura 2B), e proliferações celulares na região de abscisão foliar (Figura 2C). Aos 25 dias, é possível observar o broto formado (Figura 2D), e aos 30 dias, as primeiras folhas normais em expansão (Figura 2E, F). Múltiplos brotos foram observados nos segmentos nodais, neste mesmo meio, aos 30 dias de cultivo (Figura 3A, B).

Tabela 1 – Efeitos da caseína hidrolisada (CH) 500 mg.L⁻¹, da cinetina (KIN), e do carvão ativado (CA) 1,5 g.L⁻¹ no meio MS, sobre a frequência (%) de segmentos nodais de plantas adultas de *Ginkgo biloba* L., na fase de isolamento, com formação de brotos axilares e múltiplos brotos, aos 30 dias de cultivo *in vitro*

Tratamentos	Frequência de segmentos nodais(%)*	
	Com formação de brotos	Com múltiplos brotos
MS (Controle)	0 ± 0 d	0 ± 0 b
MS+CH	85,0 ± 13,6 a	35,0 ± 13,6 a
MS+CH+KIN 0,46 µM	50,0 ± 17,6 b	10,0 ± 13,6 b
MS+CH+KIN 4,65 µM	45,0 ± 20,9 bc	5,0 ± 11,1 b
MS+CH+CA	0 ± 0 d	0 ± 0 b
MS+CH+KIN 0,46 µM+CA	20,0 ± 11,1 cd	0 ± 0 b
MS+CH+KIN 4,65 µM+CA.	25,0 ± 17,6 bcd	5 ± 11,1 b

Médias ± desvio padrão de 5 repetições de 4 explantes.

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

*Dados originais transformados em arco sen [raiz(x/100)].

A KIN provocou aumento na frequência de formação de brotos, quando compara ao controle, porém, reduziu esta resposta quando comparada ao tratamento que continha somente a CH. Na concentração de 0,46 µM, a KIN induziu a formação de brotos em 50% dos segmentos nodais, e de múltiplos brotos em 10 % destes, sendo que aumentando sua concentração para 4,65 µM, houve redução, pouco significativa, na formação de brotos (Tabela 1).

Não houve formação de brotos, ou múltiplos brotos, quando o CA foi adicionado ao meio de cultura, demonstrando efeito tóxico sobre os explantes de ginkgo. No entanto, quando a KIN foi adicionada ao meio, os efeitos do CA se tornaram menos pronunciados, ocorrendo a formação de brotos (Tabela 1).

3.2 Multiplicação de brotos

Comportamento semelhante ao que ocorreu na fase de isolamento, foi observado na fase de multiplicação dos brotos, com melhores resultados obtidos com a utilização de 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada no meio de cultura. Neste tratamento, 66,6% dos brotos multiplicaram, emitindo novos brotos (Figura 3C, D), e 33,3% emitiram múltiplos brotos (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeitos da caseína hidrolisada (CH) 500 mg.L⁻¹, da cinetina (KIN), e do carvão ativado (CA) 1,5 g.L⁻¹ no meio MS, sobre a frequência (%) de explantes de *Ginkgo biloba* L., na fase de multiplicação, com formação de novos brotos e múltiplos brotos, aos 30 dias de cultivo *in vitro*

Tratamentos	Frequência de brotos(%)*			
	Com novos brotos		Com múltiplos brotos	
MS (Controle)	0 ± 0	c	0 ± 0	b
MS+CH	66,6 ± 27,2	a	33,3 ± 0	a
MS+CH+KIN 0,46 µM	25,0 ± 31,9	b	8,3 ± 16,6	b
MS+CH+KIN 4,65 µM	16,6 ± 19,2	b	0 ± 0	b
MS+CH+CA	0 ± 0	c	0 ± 0	b
MS+CH+KIN 0,46 µM+CA	8,3 ± 16,6	c	0 ± 0	b
MS+CH+KIN 4,65 µM+CA	8,3 ± 16,6	c	0 ± 0	b

Médias ± desvio padrão de 5 repetições de 4 explantes.

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

*Dados originais transformados em arco sen [raiz(x/100)].

Diferentes tipos de misturas complexas como extratos de sementes e de frutos, água de coco, caseína hidrolisada, entre outras, podem ser adicionadas aos meios, com o objetivo de estimular o crescimento *in vitro* das culturas. Extrato de endosperma de sementes maduras de ginkgo, adicionado ao meio de cultura MS, foi essencial para a indução de brotos em segmentos nodais de plântulas e em gemas apicais de ginkgo (TOMMAZI e SCARAMUZZI, 2004). Misturas complexas, no entanto, sem composição definida, dificultam a reprodução dos resultados e são variáveis (CALDAS et al., 1998). Nas e Read (2004) desenvolveram um meio ideal para o cultivo *in vitro* de avelã, baseados na constituição de minerais e vitaminas encontradas em extratos das sementes desta planta.

A CH é uma forma orgânica de nitrogênio, que fornece um conjunto de aminoácidos que estimulam o crescimento de muitas culturas *in vitro* (CALDAS et al., 1998). Neste trabalho, a CH foi essencial, tanto para o desenvolvimento das gemas axilares como para a formação de múltiplos brotos na fase de isolamento e de multiplicação dos brotos. O efeito positivo da CH foi observado também no desenvolvimento de gemas axilares de segmentos nodais juvenis de plântulas de ginkgo, germinadas *in vitro* (HAO et al., 2000).

Os efeitos da KIN e do CA, verificados na fase de isolamento, foram também observados na multiplicação dos brotos. Houve redução na

freqüência de formação de brotos na presença destas duas substâncias quando comparadas ao tratamento contendo apenas CH (Tabela 2). Os resultados indicam que tanto a KIN, quanto o CA, provocaram toxicidade nas culturas de ginkgo. Estes efeitos foram intensificados ao longo de três subcultivos na presença destas substâncias. Os brotos apresentaram folhas atípicas, mal formadas, de aspecto vítreo, indicando sintomas de hiperidricidade, além de menor desenvolvimento, quando comparados aos brotos formados e subcultivados na presença isolada de CH.

Os efeitos do carvão ativado estão relacionados às propriedades de adsorção de substâncias tóxicas do meio de cultivo e redução da incidência de luz no meio (BONGA, 1985). Desta forma, os efeitos positivos do carvão ativado são citados por promover maior alongamento, multiplicação e qualidade de brotos de caixeta (MANTOVANI et al., 1999), maior freqüência de enraizamento de brotos de louro-pardo (MANTOVANI et al., 2001), e maior capacidade regenerativa de segmentos de plântulas de ginkgo (HU et al., 2002). Neste experimento, no entanto, o CA provocou efeitos inibitórios na formação e multiplicação de brotos. Da mesma forma, Paek e Hahn (2000) reportam os efeitos negativos do CA no cultivo *in vitro* de lisianthus.

Avaliações do comportamento de brotos de ginkgo, durante o período de multiplicação, revelam que as citocininas podem induzir efeitos negativos nestes brotos ao longo dos subcultivos. Mantovani et al. (2006), observaram que, em meio MS, na concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, a KIN foi melhor que o BAP e que o TDZ na formação de brotos de ginkgo. Porém, a presença das citocininas em subcultivos sucessivos, provocou efeitos negativos no desenvolvimento e na qualidade dos brotos, como a formação de folhas atípicas de aspecto vítreo, desenvolvimento de calos, principalmente na presença de BAP e TDZ, e redução na capacidade regenerativa.

Os reguladores de crescimento ANA e ZEA, e a adenina, quando adicionados ao meio de cultura MS, também inibiram o desenvolvimento de brotos e provocaram a formação de calos em gemas axilares e segmentos nodais de plântulas de ginkgo (HAO et al., 2000).

3.3 Padrões de desenvolvimento de gemas caulinares *in vitro* versus *in vivo*

Existem dois padrões distintos de desenvolvimento *in vitro* de gemas axilares em segmentos nodais excisados de ramos herbáceos de *Ginkgo biloba*.

Foram observadas gemas axilares formando brotos curtos, com segmentos internodais muito próximos (Figura 3E). Estes brotos apresentam crescimento lento e limitado à expansão de algumas folhas, cerca de 4 ou 5, durante o período de 30 de cultivo na fase de isolamento. Neste tipo de broto, não foi verificado qualquer alongamento apical durante a fase de isolamento ou na fase de multiplicação.

O outro padrão de desenvolvimento foi a formação de brotos longos, distintos dos anteriores por apresentarem nós e folhas separados por segmentos internodais distintos, mais longos que os anteriores (Figura 3F), e filotaxia espiralada. Estes brotos se alongaram, tanto na fase de isolamento como na de multiplicação.

Não foi possível estabelecer uma relação entre os padrões de desenvolvimento dos brotos com a posição ocupada pelo segmento nodal no ramo de origem, nas plantas matrizes. Segmentos nodais, retirados de um mesmo ramo, desenvolveram brotos axilares longos, enquanto que outros desenvolveram brotos curtos, independentemente da posição proximal ou distal no ramo.

Durante o desenvolvimento dos ramos nas plantas matrizes de ginkgo, verificou-se que brotos curtos (Figura 1B) e longos (Figura 1C) se originam do desenvolvimento de gemas axilares de um mesmo ramo longo. Segundo Gifford e Foster (1989), os brotos curtos podem manter um padrão de desenvolvimento vegetativo, lento, com expansão anual de algumas folhas, por muitos anos. Este padrão, no entanto, é reversível, pois um broto curto pode abruptamente desenvolver um longo e, por outro lado, o crescimento apical de um broto longo pode ser retardado por várias estações, simulando o padrão de crescimento de um broto curto lateral.

Apesar deste dimorfismo, os meristemas apicais são semelhantes nos dois tipos de brotos (GIFFORD e FOSTER, 1989). Nos brotos curtos, no

entanto, os meristemas podem estar determinados a originar estruturas portadoras de megaesporângios ou de microesporângios, quando a planta se encontra em fase reprodutiva, como observado nas plantas-matrizes de ginkgo (Figura 1D, E, F, G).

Durante o período de crescimento dos brotos longos nas plantas matrizes (primavera-verão), foi evidenciada dominância das gemas apicais, em detrimento do crescimento das gemas axilares de posições basais dos ramos. Durante este período de crescimento ativo dos ramos, as gemas axilares não se desenvolvem formando ramos laterais. Na estação de crescimento ativo, no ano seguinte, gemas axilares do mesmo ramo longo se desenvolvem, dando origem a brotos curtos ou longos, independentemente da posição nos ramos.

Este comportamento de desenvolvimento dos ramos define a arquitetura da copa das árvores de ginkgo. Portanto, plantas jovens apresentam um hábito de crescimento que se assemelha ao das coníferas e, com o aumento da idade, a copa torna-se larga e o padrão de ramificação irregular (GIFFORD e FOSTER, 1989; LORENZI e MATTOS, 2002).

O dimorfismo de brotos, verificado durante o cultivo *in vitro* de ginkgo, independe da posição em que a gema ocupa no ramo de que foi retirada, e é um comportamento natural da espécie. Este comportamento, no entanto, se manifesta na irregularidade de respostas *in vitro*, com gemas que não se desenvolvem, brotações que alongam e outras que se mantêm na forma de rosetas, como ramos curtos.



Figura 1 – Plantas-matrizes de *Ginkgo biloba* L., cultivadas em casa de vegetação (A); B – brotos curtos; C – broto longo (seta cheia), broto curto (seta vazada) e folha bilobada (ponta de seta); D a G – seqüência do desenvolvimento de estruturas portadoras de microesporângios em brotos curtos; H – segmento nodal lenhoso; I – segmentos nodais herbáceos; J - segmento nodal *in vitro*, contaminado por fungos; K – segmento nodal herbáceo *in vitro*, apresentando necrose.

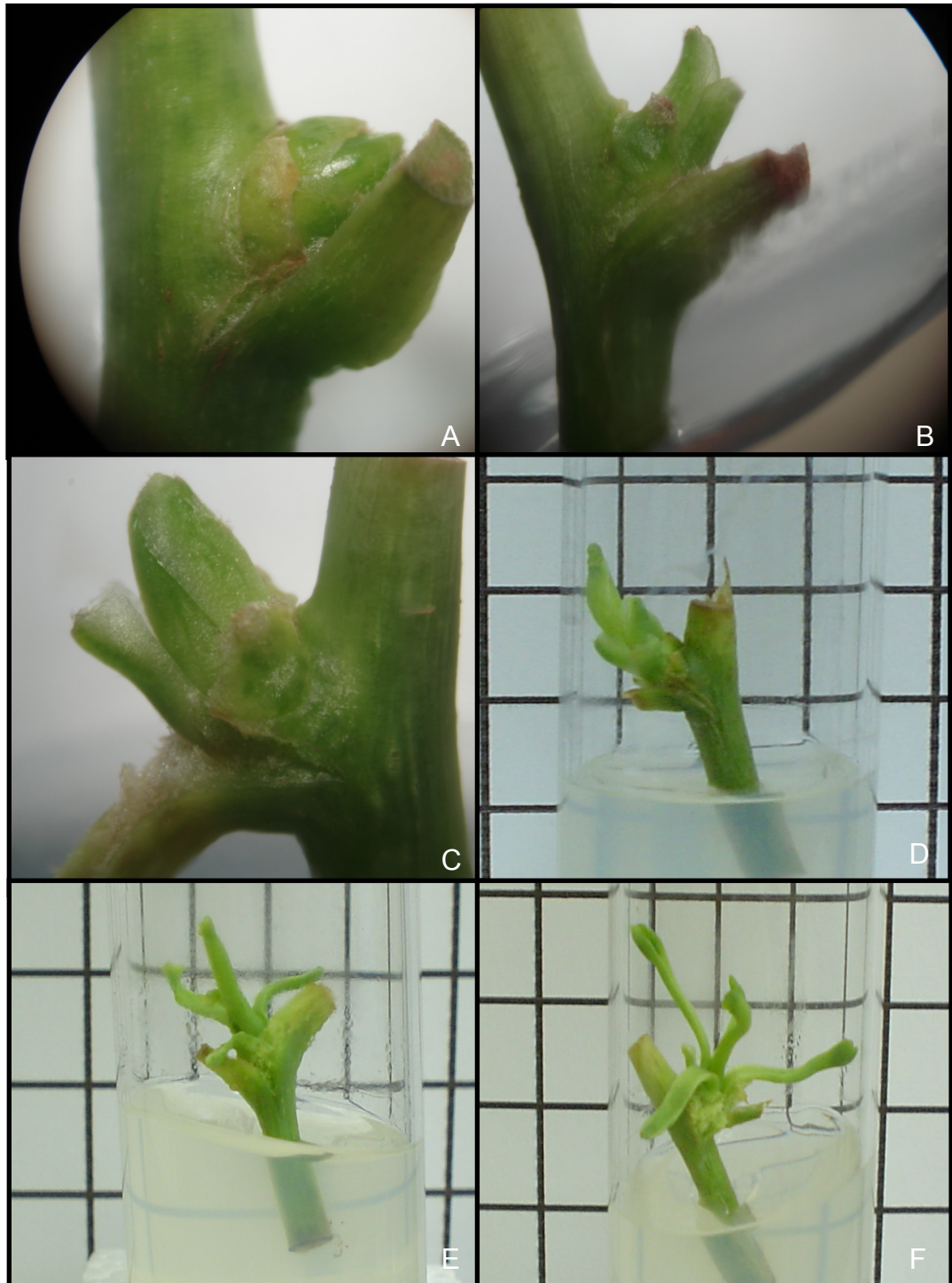


Figura 2 – Estádios de desenvolvimento de brotos a partir de gemas axilares em segmentos nodais de plantas adultas de *Ginkgo biloba* L., cultivados em meio de cultura MS suplementado com 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada. A – aos 10 dias; B – aos 15 dias; C – aos 20 dias; D – aos 25 dias; E – F - aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

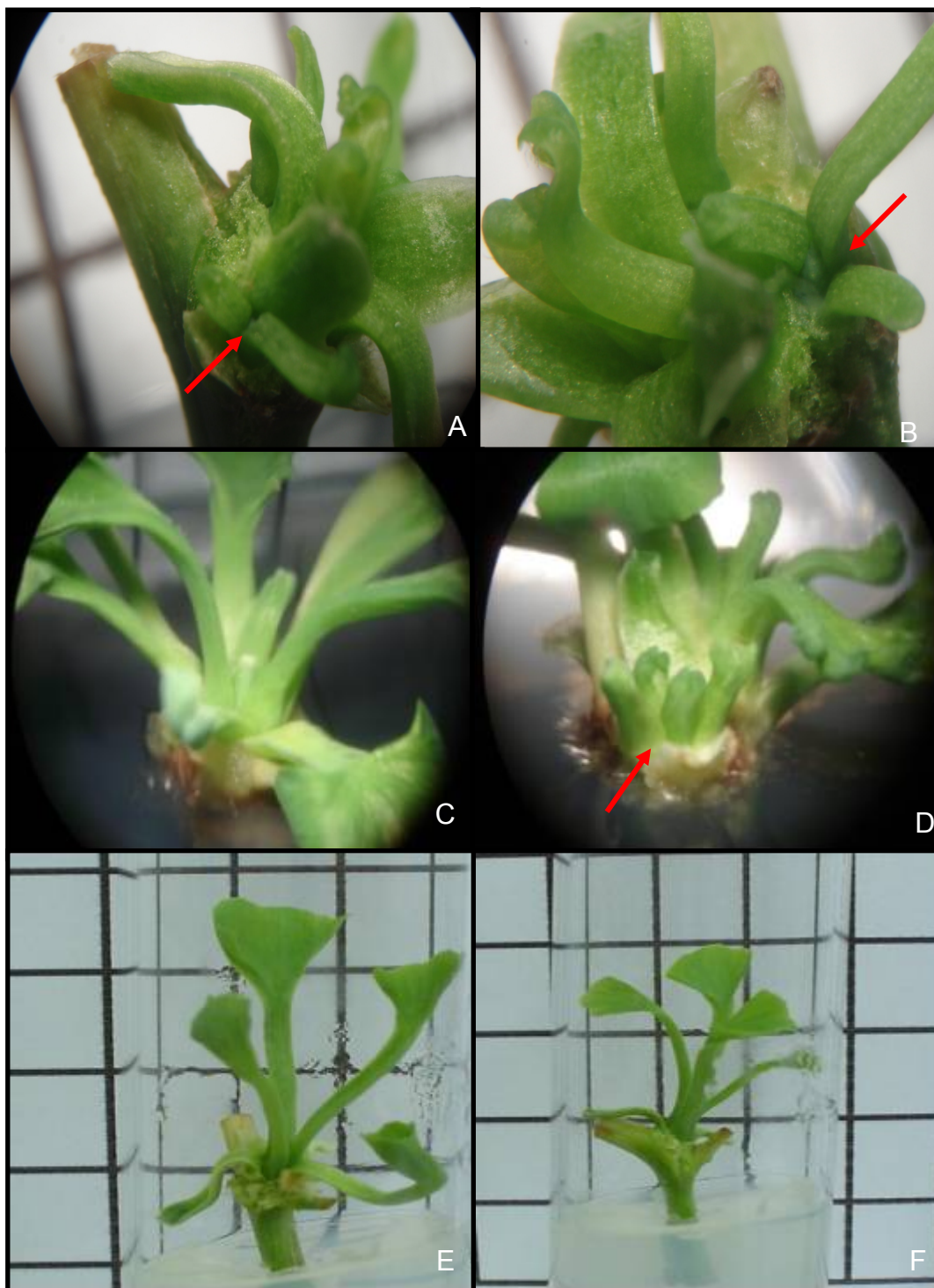


Figura 3 – Desenvolvimento e multiplicação de brotos a partir de gemas axilares em segmentos nodais de plantas adultas de *Ginkgo biloba* L., cultivados em meio de cultura MS suplementado com 500 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada A, B – indução de múltiplos brotos em segmentos nodais (setas indicando novos brotos); C, D – multiplicação de brotos (seta indicando novo broto); E, F – padrões de desenvolvimento de brotos de gemas axilares em segmentos nodais, E - broto curto; – F – broto longo.

4 CONCLUSÕES

Segmentos nodais herbáceos, de plantas adultas, podem ser utilizados como explantes visando o estabelecimento de um sistema de propagação *in vitro* de *G. biloba*. Os resultados demonstram alta capacidade regenerativa destes explantes.

A caseína hidrolisada induz a formação de brotos axilares e múltiplos brotos nos segmentos nodais, na fase de isolamento, e também na fase de multiplicação, enquanto que a cinetina e o carvão ativado provocam efeitos inibitórios neste processo.

Brotos curtos e brotos longos caracterizam o padrão de desenvolvimento de brotos axilares de ginkgo, observado em segmentos nodais cultivados *in vitro*, à semelhança do que ocorre *in vivo*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALZ, J.P.; COURTOIS, D.; DRIEU, J.; DRIEU, K.; REYNOIRD, J.P.; SOHIER, C.; TENG, B.P.; TOUCHÉ, A.; PÉTIARD, V. Production of Ginkgolides and Bilobalide by *Ginkgo biloba* plants and tissue cultures. **Planta Medica**, v. 65, n. 7, p. 620-626. 1999.
- BONGA, J. M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J. M., DURZAN, D. J. (Eds.) **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p.4-35.
- BRENNER, E.D.; KATARI, M.S.; STEVENSON, D.W.; RUDD, S.S.; DOUGLAS, A.W.; MOSS, W.N.; TWIGG, R.W.; RUNKO, S.; STELLARI, G.M.; McCOMBIE, W.R.; CORUZZI, G.M. EST analysis in *Ginkgo biloba*: an assessment of conserved developmental regulators and gymnosperm specific genes. **BMC Genomics**, v 6, n.1 43, 2005. [<http://biomedcentral.com/1471-2164/6/143>].
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI/ Embrapa – CNPH, 1998. p. 87-132.
- CAMPER, N.D.; COKER, P.S.; WEDGE, D. E.; KEESE, R. J. *In vitro* culture of *Ginkgo*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 33, p. 125-127, 1997.
- CARRIER, D.J.; CHAURET, N.; MANCINI, M.; COULOMBE, P.; NEUFELD, R.; WEBWER, M.; ARCHAMBAULT, J. Detection of ginkgolide A in *G. biloba* cell cultures. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 256-259, 1991.
- CHOI, P. S.; CHO, D. Y.; SOH, W. Y. Shoot organogenesis from immature zygotic embryo cultures of *Ginkgo biloba*. **Biologia Plantarum**, v. 47, n. 2, p. 309-319, 2003/4.
- DUPRÉ, P.; LACOUX, J.; NEUTELINGS, G.; LAURAIN, D. M.; FLINIAUX, M. A.; DAVID, A.; DUBREUIL, A. J. Genetic transformation of *Ginkgo biloba*, by *Agrobacterium tumefaciens*. **Physiologia Plantarum**, v. 108, n. 4, p.413-419. 2000.
- GIFFORD, E.M.; FOSTER, A.S. **Morphology and evolution of vascular plants**. New York: W.H. Freeman and Company, 1989.
- GRAY, D. E.; UPTON, R.; CHANDRA, A.; PORTER, A.; HARRIS, R. K. Quantitative analysis of flavonol glycosides in *Ginkgo biloba*: a comparison of two analytical methods. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p. 56-62, 2006.
- HAO, G. P.; DU, X. H.; YOU, Y.; HOV, F. L.; FAN, Z. G.; ZHANG, H. J. Effects of various factors on the growth and development of cultured axillary buds of *Ginkgo biloba in vitro*. **Forest Research**, v. 13, n. 2, p. 217-221, 2000.
- HU, H.; YANG, J.; YANG, D.; WANG, Y. Study on stem section culture conditions *in vitro* in *Ginkgo biloba*. **Scientia Silvae Sinicae**, v. 38, n. 3, p. 52-56, 2002.

- KANG, S. M.; MIN, J.Y.; KIM, Y. D.; KANG, Y. M.; PARK, D. J.; JUNG, H. N.; KIM, S. W.; CHOI, M. S. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of bilobalide and ginkgolides in cell cultures of *Ginkgo biloba*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 42, p. 44-49, 2006.
- LAURAIN, D.; CHÉNIEUX, J. C.; TRÉMOUILLAUX-GUILLER, J. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Ginkgo biloba*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 19-24, 1996.
- LORENZI, H. MATTOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, S. P: Instituto Plantarum, 2002. p. 36.
- MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; GUERRA, M.P. Micropropagação de caixeta *Didymopanax morototoni* (AUBL) DCNE ET PLANCH. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 1, p. 47-61, 1999.
- MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de Louro-Pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2001.
- MANTOVANI, Nilton César; GRANDO, Magali Ferrari; OTONI, Wagner C; GRISON, Tobias P; REGINATO, Flávio H; AUGUSTIN, Lizete; SUZIN, Marilei. Morfogênese e regeneração *in vitro* de *Ginkgo biloba* L. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 231, 2006.
- MONTEZ-LOPEZ, J. J.; RODRIGUEZ, J. L. de La O. *In vitro* establishment and sprouting of axillary buds and shoot apex of ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). **Revista Chapingo Serie Horticultura**, v. 7, n. 1, p. 49-59, 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAS, M.N.; READ, P.E. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. **Scientia Horticulturae**, v. 101, p. 189-200, 2004.
- PAEK, K. Y.; HAHN, E. J. Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 36, p. 128-132, 2000.
- SEXTO, P. A. da S. **Cultivo *in vitro* e estadia de *Ginkgo biloba* L.** 2005. 179 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2005.
- SOHIER, C.; COURTOIS, D. *Ginkgo biloba* and production of secondary metabolites. In: KAYSER, O.; QUAX, W.J. (Eds.). **Medicinal plant biotechnology: from basic research to industrial applications**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim. p. 493-514, 2007.
- TOMMASI, F.; SCARAMUZZI, F. *In vitro* propagation of *Ginkgo biloba* by using various bud cultures. **Biologia Plantarum**, v. 48, n. 2, p. 297-300, 2004.
- VAN BEEK, T. A. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. **Journal of Chromatography**, v. 937, p. 21-55, 2002.

YU, R.; ZHAO, H.; ZHENG, Y.; YAO, X.; ZHANG, H. Studies on the callus cultures of *Ginkgo biloba* and its metabolites-Ginkgolides. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 51-58, 1999.

YU, R. M.; GAO, Y.; SONG, L. Y.; ZHANG, D. Z.; YE, W. C.; YAO, X.S. The immobilized cells cultures of *Ginkgo biloba* and the production of ginkgolides. **Acta Botanica Yunnanica**, v. 26, n. 3, p. 338-344, 2004.

CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos com este trabalho indicam que:

- A avaliação da produtividade de sementes e do teor de bixina, auxiliou na seleção de genótipos superiores de *Bixa orellana* L., a serem propagados vegetativamente;

- A alporquia possibilitou o resgate vegetativo de genótipos de *B. orellana* e o estabelecimento de um banco de plantas fornecedoras de explantes úteis para processos de propagação clonal;

- Foi possível estabelecer um sistema de propagação *in vitro* de *B. orellana* a partir da indução de crescimento e proliferação de brotos axilares em segmentos nodais obtidos de alporques e, a partir da diferenciação direta e proliferação de brotos adventícios em segmentos hipocotiledonares, radiculares e cotiledonares de plântulas germinadas *in vitro*. Estas metodologias são viáveis para a propagação *in vitro* de *B. orellana* e como forma de superar a segregação genética, observada nas plantas propagadas por sementes, podendo contribuir para o desenvolvimento de um sistema de transformação genética desta espécie;

- A frequência calogênica e o desenvolvimento dos calos induzidos em explantes foliares de plantas adultas de *Ginkgo biloba* L. foram influenciados pelo tipo de explante cultivado, tipo, concentração e balanço estabelecido entre auxinas e citocininas, tipo de carboidrato adicionado ao meio de cultura e, pelo regime luminoso fornecido durante o subcultivo dos calos. Terpenóides e flavonóides glicosilados de ginkgo não foram detectados nos calos e nas folhas, porém a metodologia utilizada na produção de calos possibilitará novas abordagens, visando à propagação de plantas de ginkgo por vias morfogênicas indiretas e, o estudo da indução *in vitro* de síntese dos metabólitos secundários de valor medicinal desta espécie;

- Foi estabelecido um sistema de multiplicação *in vitro* de *G. biloba* a partir da indução de crescimento e proliferação de brotos axilares em segmentos nodais herbáceos de plantas adultas, possibilitando uma alternativa à propagação sexuada e assexuada desta espécie.