

MICROPROPAGAÇÃO DE *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS E ÁPICES CAULINARES

Francisco Fábio Mesquita Oliveira

Aluno do Curso de Ciências Biológicas, UERN, bolsista do PIBIC/CNPq, Caixa Postal 70, 59610-090 Mossoró-RN, Brasil.
e-mail: fabiomesq@universia.com.br ou ffrabiomesquita@gmail.com

Kathia Maria Barbosa e Silva

Eng. Agr^a., Dra. Professora adjunta, UERN, Caixa Postal 70, 59610-090 Mossoró-RN, Brasil. e-mail:
kathiafanat@uern.br ou mmcama.ct@uern.br

Goretti Fernandes de Oliveira

Aluna do Curso de Ciências Biológicas, UERN, Caixa Postal 70, 59610-090 Mossoró-RN, Brasil. e-mail:
goretifoliveira@bol.com.br

Iron Macêdo Dantas

Eng. Agr^o., Dr. Professor adjunto, UERN, BR 110, KM 46, Costa e Silva CE: 59610-090 Mossoró-RN, Brasil. e-mail:
irondantas@uern.br

Ramiro Gustavo Valera Camacho

Eng. Agr^o., Dr. Professor adjunto, UERN, BR 110, KM 46, Costa e Silva CE: 59610-090 Mossoró-RN, Brasil. e-mail:
ramirogv@uern.br

RESUMO - *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth., espécie nativa do nordeste brasileiro conhecida como sabiá, pertence à família Mimosaceae. Devido às suas múltiplas utilidades, é uma espécie explorada generalizadamente, especialmente para produção de madeira. Sua propagação por sementes não é fácil e, além disso, apresenta ampla variabilidade genética, o que estimula a propagação vegetativa de boas matrizes. Dois experimentos foram realizados visando a propagação da sabiá a partir de meristemas apicais. No primeiro, avaliaram-se diferentes combinações de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) e BAP benzilaminopurina (BAP) e, no segundo, dois meios de cultura suplementados com água de coco. No primeiro experimento, os explantes foram obtidos de plantas com três anos de idade e inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) em diferentes concentrações de 2,4-D e BAP. Foram avaliados o número de brotos por explante, número de explantes brotados e número médio de calos e percentual de contaminação. No segundo experimento, utilizaram-se explantes de plântulas germinadas *in vitro*, das quais foram obtidos explantes, que foram inoculados em 25 mL dos seguintes meios de cultura: MC1 (20% de água-de-coco (v/v), mio-inositol (0,1g.L⁻¹), ácido ascórbico (0,09 g.L⁻¹) e MC2 (20% água-de-coco (v/v), mio-inositol (0,1g.L⁻¹), ácido ascórbico(0,1g.L⁻¹), (0,0155g.L⁻¹), tiamina (0,02g.L⁻¹), boro (0,0015g.L⁻¹), extrato de malte (0,3g.L⁻¹), ambos solidificados com (7,0g.L⁻¹) de agar. Nesse experimento, foram avaliados os números de brotos por explantes, número de explantes brotados e número médio de calos. As combinações de 2,4-D e BAP não promoveram resposta morfofogenética nos tecidos inoculados. A infestação fúngica foi de 34%. MC1 e MC2 induziram, em média, a formação de calos em 85,8 % dos explantes inoculados.

Palavras-chave: Sabiá, Micropropagação, 6-benzilaminopurina, ácido 2,4 diclorofenoxiacético, água de coco.

MICROPROPAGATION OF *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. SHOOTS FROM NODALS SEGMENTS AND SHOOT APEX

ABSTRACT – *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth., (Mimosaceae) it's a Northeast native species from Brazil and cause its multiple utilities, it has been intensively used. Is conventionally propagated through seeds, but this process isn't easy and plant with a wide range of genetic variability. For this reason, the micropropagation assumes importance. Two experiments had been lead, being that in the first, different combination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and benzilaminopurine (BAP) were evaluated and in the second, two ways of culture. In the first experiment the explants had been gotter from three years old plants and inoculated with MS medium (Murashige & Skoog, 1962) substance in different concentrations of 2,4-D and BAP. The observed variables were number of shoots for explants, number sprouted explants and percentile of contamination. In the second experiment explants from sprouted *in vitro* plantlets inoculated with a complementary formularization substances called **MC1** (25 mL of medium with next composition: 20% water coconut (v/v), myo-inositol (0,1 g.L⁻¹), ascorbic acid (0,09g.L⁻¹)) and **MC2** (20% water coconut (v/v), myo-inositol (0,1 g.L⁻¹), ascorbic acid (0,1 g.L⁻¹), (0,0155 g.L⁻¹), tiamin (0,02 g.L⁻¹), boron (0,0015 g.L⁻¹), extract of malt (0,3 g.L⁻¹)), both solidified with agar (7g.L⁻¹). In these experiments the observed variables were number of shoots per treatment and number of callus per treatment. In the combination of 2,4-D and BAP, none morphogenetic reply in the inoculeted tissues was identified. The substances **MC1** and **MC2** had induced in average callus sprouted in 85,8% of the inoculeted explants. In the first experiment, 34% were infested by fungus.

Key words: Sabiá, Micropropagation, 6-benzilaminopurine, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, coconut-water.

INTRODUÇÃO

Mimosa caesalpiniaefolia Benth, conhecida vulgarmente como sabiá, unha de gato e sansão-do-campo é uma espécie pioneira, decídua, heliófita, com ocorrência preferencial em solos profundos tanto em formações primárias quanto secundárias LORENZI (2000). Nativa do Nordeste do Brasil, esta espécie pertence à família Mimosaceae, e se constitui em uma essência florestal, porque a árvore além de apresentar características ornamentais, sua madeira é apropriada para uso externo, como mourões, estacas, postes, lenha e carvão (MENDES, 1989). Além disso, é uma planta altamente tolerante a luz direta, de alta precocidade e é considerada uma importante fonte de alimento para os animais, especialmente os caprinos, que na época de estiagem, se alimentam das folhas que caem e entram em processo de fenação, propiciando uma fonte a mais de alimento para os animais (MENDES, 1989).

Adicionalmente, a sabiá é ideal para reflorestamentos heterogêneos destinados à recomposição de áreas degradadas (LORENZI, 2000), uma vez que recupera o solo por meio da fixação do nitrogênio, pelo aporte de matéria orgânica originada da queda de suas folhas (LEAL JÚNIOR *et al.*, 1999), elevado poder de rebrote, além de beneficiar outras espécies que eventualmente venham a ser plantadas em consórcio com ela (MENDES, 1989).

As sementes de sabiá apresentam elevado percentual de germinação, principalmente se as sementes forem jovens e submetidas a processos mecânicos, físicos ou químicos que abreviem o processo (ALVES *et al.*, 2004) No entanto, nesse vegetal, a multiplicação via semente, que é o processo mais empregado, tem como desvantagem contribuir para uma grande falta de uniformidade nos povoamentos florestais. Além disso, por ocasião da dispersão natural das sementes, ocorrem grandes perdas devido à disseminação dos craspédios, designados por pequenos segmentos unisseminados, os quais formam a vagem (ALVES *et al.*, 2004). Visando reduzir a variabilidade desses povoamentos, bem como produzir uma grande quantidade de mudas é que se buscam alternativas para a propagação vegetativa da espécie citada. Nesse sentido, Hartman *et al.* (1990) afirmam que a multiplicação de forma assexual, especificamente a micropropagação, é indiscutivelmente a técnica que oferece vantagens de gerar material clonal que possibilita superar os problemas com a propagação por meio de semente.

A micropropagação, termo sugerido por Hartman *et al.* (1990), compreende o cultivo asséptico de partes da planta em condições controladas de nutrição, luminosidade, fotoperíodo e temperatura. Como forma de propagação vegetativa, baseada em técnicas de

cultura de tecidos *in vitro*, a micropropagação torna-se uma alternativa para a regeneração de plantas que apresentam dificuldades de reprodução natural, e também onde os métodos convencionais de propagação vegetativa não se tornam viáveis (THORPE *et al.*, 1991).

Essa técnica tem sido de grande importância para a propagação de plantas de interesse agrícola, ornamental e florestal (TEIXEIRA, 2001). A técnica permite a produção de mudas sadias em espaço físico reduzido, além de ser altamente conveniente para a manutenção de coleções de plantas de genótipos diferentes. Com isso, pode-se otimizar a produção em grande escala de mudas de sabiá, sem reduzir o número de sementes liberadas na natureza, o que garantiria uma maior chance de propagação natural das mesmas uma vez que é muito baixo o poder de germinação da mesma até mesmo em laboratório onde precisam no geral de escarificação. O desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* de sabiá, além de possibilitar a produção de uma maior quantidade de mudas a ser disponibilizados aos produtores, pode contribuir para a sua reposição de plantas em áreas degradadas, contribuindo para a conservação da espécie e do meio.

Este trabalho teve por objetivo avaliar diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (BAP), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), bem como meios de cultura complementares, no estabelecimento *in vitro* de explantes de sabiá.

METODOLOGIA

Experimento I

O experimento I foi implantado em 24/09/2004 e conduzido no Laboratório de Cultura de Tecido Vegetal/UERN/Mossoró-RN. As plantas de sabiá de onde se tirou os explantes se encontravam em estágio final de reprodução. O trabalho constou de uma multiplicação *in vitro* de ápices caulinares e segmentos nodais de plantas adultas utilizando os meios MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D e BAP.

Para estabelecimento de *M. caesalpiniaefolia* Benth, *in vitro*, utilizou-se plantas com três anos de idade, mantidas no arboreto localizado no Campus Central da UERN, como fonte de explantes. Os ramos, com duas gemas foram coletados e levados ao laboratório onde foram colocados em uma bandeja sob água corrente durante 10h. Em câmara de fluxo laminar, realizou-se a desinfestação dos mesmos com imersão em etanol 70% por 15 minutos, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio à 1,8%, durante 20 minutos. Posteriormente, sob condições assépticas, procedeu-se à lavagem dos explantes com

água destilada autoclavada, por três vezes, para a completa remoção dos resíduos de cloro.

Utilizou-se 30 ápices caulinares (com 2 gemas cada) para cada tratamento. Os segmentos nodais utilizados foram retirados da região subjacente aos ápices caulinares. O isolamento dos ápices e segmentos foi efetuado com o auxílio de uma pinça e bisturi. Os explantes, com 1,5 cm de comprimento, foram transferidos para frascos de vidro (12,5 x 5,5 cm) contendo 25 mL de sais e vitaminas de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), mio-inositol (100 mg.L⁻¹), sacarose (30 g.L⁻¹), ágar (7 g.L⁻¹), suplementados com benzilaminopurina (BAP) (0,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10 µM.L⁻¹) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0,0; 2,0; 4,0 e 6,0 µM.L⁻¹), de acordo com os seguintes tratamentos: **T1** = 0,0 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,0 mg.L⁻¹ BAP; **T2** = 2,0 µM.L⁻¹ 2,4-D + 8,0 µM.L⁻¹ BAP; **T3** = 2,0 µM.L⁻¹ 2,4-D + 4,0 µM.L⁻¹ BAP; **T4** = 4,0 µM.L⁻¹ 2,4-D + 2,0 µM.L⁻¹ BAP; **T5** = 6,0 µM.L⁻¹ 2,4-D + 10 µM.L⁻¹ BAP; **T6** = 2,0 µM.L⁻¹ 2,4-D + 10 µM.L⁻¹ BAP.

A unidade experimental foi composta de 3 explantes por frasco. O experimento foi delineado inteiramente ao acaso, com 6 tratamentos e 10 repetições por tratamento. Os resultados obtidos foram analisados a partir do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. As variáveis avaliadas foram: número médio de calos, número de explantes brotados e percentagem de contaminação por tratamento. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 utilizando uma solução tampão de NaOH e/ou HCl a 1M, antes da inclusão do agar na concentração de 6,0 g.L⁻¹, sendo o meio posteriormente autoclavado a 121 °C e 1,5 atm por 15 minutos. As culturas foram mantidas em uma câmara de crescimento sob controle de temperatura, 26 ± 2 °C, e fotoperíodo de 16 horas fornecido por lâmpadas do tipo GROWLUX.

Experimento II

O experimento II, montado em 30/09/2004 no mesmo local, constou do estabelecimento *in vitro* de explantes de sabiá obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro*, e foi realizado no mesmo local do experimento I.

As sementes de sabiá foram provenientes do arboreto localizado no Campus Central da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, sendo coletadas após a maturação e, em seguida levadas ao laboratório de Cultura de Tecido Vegetal, para a desinfestação. No processo de desinfestação foram utilizadas sementes escarificadas, com lixa manual, número 80, sendo que, as mesmas foram lavadas em água corrente durante 5 minutos e levadas à câmara de fluxo laminar, onde foram imersas em solução de etanol 70% durante 8 minutos em seguida foram transferidas para uma solução de hipoclorito a 1% e mantidas sob agitação por 8 minutos e,

posteriormente lavadas 3 vezes em água destilada e esterilizada, com duração de 10 minutos cada lavagem, para a eliminação dos resíduos de hipoclorito. Após a assepsia, as sementes de sabiá foram inoculadas em frascos contendo 25 mL de meio de cultura com a seguinte formulação: mio-inositol (0,1g.L⁻¹), ácido ascórbico (0,063 g.L⁻¹), 15% de água de coco (v/v) e solidificado com (6,0 g.L⁻¹) de agar e o pH foi ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave a 120 °C, durante 20 minutos. Em cada frasco foram inoculadas 4 sementes. Após a inoculação os frascos foram transferidos para câmara de germinação com temperatura de 26 ± 2°C e fotoperíodo de 16h. Nove dias depois, as sementes germinadas foram utilizadas como fonte de explantes.

A partir de sementes germinadas *in vitro* foram retirados ápices caulinares com 1,5 cm de comprimento que foram inoculados em frascos contendo 25 mL de meio de cultura com a seguinte composição: 20% de água de coco (v/v), mio inositol (0,1 g.L⁻¹), ácido ascórbico (0,09 g.L⁻¹) e solidificado com 7,0 g.L⁻¹ de agar. Este meio de cultura foi identificado como **MC1** (meio complementar 1). Da mesma forma, realizou-se a inoculação de ápices caulinares, oriundos de plântulas germinadas *in vitro*, em outro meio de cultura, denominado **MC2** (meio complementar 2). Este último meio continha os seguintes componentes: 20% água de coco (v/v), mio-inositol (0,1 g.L⁻¹), ácido ascórbico (0,1 g.L⁻¹), (0,0155 g.L⁻¹), tiamina (0,02 g.L⁻¹), boro (0,0015 g.L⁻¹), extrato de malte (0,3 g.L⁻¹). O meio foi solidificado com (7,0 g.L⁻¹) de agar. Os dois meios de cultura correspondem aos tratamentos do experimento II. Cada parcela experimental foi composta por 1 frasco com 3 explantes. Os explantes foram distribuídos em 40 frascos (20 frascos para o tratamento **MC1** e 20 para o tratamento **MC2**).

Os frascos foram mantidos a uma temperatura de 26 ± 2°C e fotoperíodo de 16h durante 41 dias. Aos 21 dias após a inoculação realizou-se a transferência dos explantes para outros meios de cultura com as mesmas composições referidas anteriormente. O pH dos referidos meios de cultura foi ajustado para 5,8 utilizando uma solução tampão de NaOH -1M.

Os dois tratamentos foram testados em Delineamento Inteiramente Casualizado e as médias comparadas pelo teste de F.

As avaliações dos dados foram realizadas diariamente, e as variáveis avaliadas foram: número de brotos e número médio de calos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I

Com relação ao comportamento dos explantes inoculados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com diferentes concentrações de BAP e 2,4-D pode-se observar que não houve efeito

dos mesmos no número de brotos por explantes, número de explantes brotados e número médio de calos, portanto não se realizou análise estatística para as variáveis citadas. Contrastando com estes resultados Bonfim e Caetano (2003), obtiveram calos primários a partir de ramos com 3,0 cm de comprimento de *Caesalpinia pyramidalis* Tul., inoculados no meio MS semi-sólido suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,2 mg.L⁻¹ de cinetina. Resultados similares foram obtidos por Carvalho *et al.* (2004). Esses autores obtiveram calos a partir de embriões somáticos maduros de caquizeiro utilizando meio MS _{1/2}NO₃ (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 10 µM.L⁻¹ de 2,4-D combinado com 2,0 µM.L⁻¹ de cinetina. Da mesma forma Brum (2001) obteve resultados similares com *Ficus carica*, variedade “Roxo de Valinhos”, utilizando meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com concentrações superiores a 2,0 mg.L⁻¹ de BAP e baixas concentrações de ANA. Nesse caso observou-se maior incremento no número total de brotos.

A formação de calos é um processo importante para a obtenção indireta de plantas. Os calos podem conter células ou grupos de células que possuem centros ativos de divisão celular. Em condições adequadas, esses centros são induzidos e se capacitam para produção de órgãos; em alguns casos nos quais já são capazes, os centros são apenas estimulados. As células que são capazes de responder a determinados estímulos são denominadas competentes; nelas podem ocorrer a diferenciação celular e a formação de brotos ou raízes (GEORGE, 1996). A competência é o primeiro passo para a diferenciação celular; o segundo é a indução da determinação em células competentes. As células são determinadas quando se submetem a um caminho particular de desenvolvimento geneticamente programado e continuam sem a influência de reguladores de crescimento (GEORGE, 1996).

Santana e Alloufa (2000) utilizaram o meio MS, suplementado com concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ da citocinina 6-Benzilaminopurina (BAP) e observaram que esta contribui para estimular a brotação de *Musa x paradisiaca* L. cv. Pacovan, sendo que a concentração de 5,0 mg.L⁻¹ de BAP propicia uma média maior no número de brotos, sendo recomendada para trabalhos que visam a obtenção de um grande número de mudas. Da mesma forma, Pasqual e Barros (1991) objetivando determinar o efeito do BAP e ANA sobre a propagação *in vitro* de cafeeiro “Catuaí” através de culturas de gemas, concluíram que a multiplicação de gemas ortotrópicas é mais estimulada por BAP 3000 µg.L⁻¹ na ausência de ANA e que a proliferação de brotos com mais de 1,0 cm ocorre na concentração de 500 µg.L⁻¹ de BAP e o uso de 200 µg.L⁻¹ de ANA é prejudicial à proliferação de brotos.

As referências citadas acima demonstram que o balanço auxina/citocinina é essencial para o

desenvolvimento vegetal, uma vez que as citocininas produzidas nas raízes podem induzir a formação de ramos, cujos ápices são produtores de auxinas, a qual é necessária à produção de raízes (KERBAUY, 2004).

A maneira complexa com que os reguladores de crescimento e as células interagem indica que, se o tecido não está em um estágio responsivo, este não irá responder adequadamente aos reguladores de crescimento exógenos, não importando em quais concentrações e combinações esses reguladores são utilizados. Frota *et al.* (2004) utilizando o sistema de cultivo *in vitro* suplementado com, BAP 2,00 mg.L⁻¹ + AIA 0,25 mg.L⁻¹ a partir de explantes de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill, obtiveram altas taxas de indução de brotações (100%). Da mesma forma, Arellano *et al.* (1991), utilizando o meio MS + 2,00 mg.L⁻¹ BAP e 0,50 mg.L⁻¹ IAA observaram um desenvolvimento intenso de calos com emissão de brotos, para cultivares Appel Bloesen e Marleen de *Gerbera jamesonii*.

A ausência na resposta a um regulador de crescimento é freqüentemente um problema maior quando explantes de plantas adultas são utilizados, em comparação com material juvenil (BONGA & VON ADERKAS, 1992) citados por ALVES *et al.* (2004). Na maioria dos trabalhos realizados visando à propagação *in vitro* de *Eucalyptus* via organogênese, utilizaram-se materiais juvenis como fonte de explantes, tais como hipocótilos (KITAHARA & CALDAS, 1975; TIBOK *et al.*, 1995; AZMI *et al.*, 1997) citados por ALVES *et al.* (2004), cotilédones (AZMI *et al.*, 1997), caule e folhas de material juvenil proveniente de sementes (MULLINS *et al.*, 1997) e embriões zigóticos (SERRANO *et al.*, 1996).

A não responsividade dos explantes de sabiá inoculados pode ser atribuída a uma intensa oxidação dos explantes inoculados.

O escurecimento de explantes tem sido relatado como uma dificuldade no estabelecimento de culturas *in vitro* em algumas espécies lenhosas, como consequência de oxidações, provavelmente em decorrência da liberação de compostos fenólicos pelos tecidos em resposta a danos físicos, altas concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura e pela oxidação de polifenóis e quininas. Blake (1983) relata que o meio líquido pode diluir substâncias responsáveis pela oxidação dos explantes. Entretanto, Ferreira *et al.* (2001) observaram o escurecimento de culturas de calos de *T. grandiflorum* em meio líquido na ausência de reguladores de crescimento.

A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado ou senescente de espécies nativas, especialmente as tropicais, que contêm alta concentração desses componentes fenólicos (GEORGE e SHERRINGTON, 1984). Esses compostos fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases produzindo substâncias tóxicas e inibindo o crescimento dos explantes, além de escurecer o meio

de cultura. Arello (1991) ao estabelecer, *in vitro*, explantes de *Kielmeyera coriacea* Martius, observou que a oxidação diminuiu a taxa de emissão de novas brotações e indicou a utilização de uma série de produtos que adsorvem os oxidantes, como o carvão ativado e o polivinilpropano.

Embora não se tenham determinadas às causas da oxidação nos explantes de sabiá uma série de fatores podem está implicados nesse processo, entre eles a ausência de antioxidantes presentes no meio de cultura, o estado nutricional da espécie e a fonte de explantes.

Adicionalmente, a oxidação observada no experimento II pode ser atribuída a uma série de fatores entre eles o nível de sacarose empregado (3%), combinado com água de coco, pode ter suprimido o crescimento somático de calos em sabiá. Tal fato foi observado por Ferreira *et al.* (2001) a partir do cultivo de embriões de *Theobroma grandiflorum* Schum., utilizando 60% de sacarose.

Pré-tratamentos dos explantes com ácido cítrico e ácido ascórbico e a adição de substâncias adsorventes ao meio de cultura, como carvão ativado e polivinilpirrolidona pode reduzir a oxidação dos mesmos. Esses agentes redutores servem como substrato para enzimas oxidativas, diminuindo a produção de substâncias tóxicas para as plantas (Ribas e Zanette, 1992). Conforme Galston e Purves (1960) os compostos precursores da lignina são polimerizados por peroxidases ou outros sistemas fenólicos oxidativos, onde a auxina afeta este processo quanto à atividade e concentração da peroxidase, e o 2,4-D sendo uma auxina potente pode afetar a oxidação da maneira acima citada. A retirada do ferro do meio de cultura também pode diminuir a oxidação, pois é cofator de grande número de enzimas oxidativas.

De forma geral, os explantes de gemas apresentaram maior número de brotações que os

explantes meristemáticos. Assim sendo, meristemas oxidados apresentaram reduzido crescimento de brotos. O mesmo havia sido observado antes, por Bhojwani *et al.* (1987) em cultivo *in vitro* de *Feijoa sellowiana*.

Um fator importante é o estado fisiológico das plantas matrizes de sabiá, das quais foi coletado o material, uma vez que as mesmas se encontravam em condições de estresse hídrico, portanto, parcialmente sem folhas. Nestas condições o metabolismo das plantas se altera de modo que as respostas dadas pelas células incluem mudanças no ciclo de divisões, mudanças no sistema de endomembranas, vacuolização (TAIZ & ZEIGER, 2004), além da diminuição da circulação da seiva e de produtos sistêmicos, impedindo dessa forma, a desinfestação dos explantes (DANTAS *et al.*, 2002). A condição fitossanitária da planta matriz é importante, pois irá facilitar a assepsia dos explantes durante o isolamento. Mesmo que seja realizado a desinfestação dos explantes, diversos microrganismos, de natureza endógena, não são expostos aos desinfestantes, sendo necessário o controle fitossanitário da planta matriz (TORRES *et al.*, 1998).

Experimento II

Com relação aos resultados obtidos para o experimento II, verificou-se que estes, para o número de brotos por explantes e número de explantes brotados por tratamento, foram semelhantes aos resultados obtidos no experimento I, isto é os tratamentos não induziram brotações. Diferentemente, obteve-se respostas significativas utilizando os meios MC1 e MC2, para a variável número médio de calos. No entanto o desdobramento das médias pelo teste F evidenciou que os dois tratamentos não apresentaram diferenças entre si (tabela 1).

*Os tratamento seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de F a 5% de probabilidade.

Tabela 1. Número médio de calos, obtidos a partir da utilização

dos meios MC1 e MC2 *

Tratamentos	Número de Calos
Meio complementar 1	2,55 a
Meio complementar 2	2,70 a

Pode-se observar o aspecto visual dos calos formados a partir de explantes de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Mart.), sendo que todas as partes dos explantes apresentaram formação de calos. Os calos apresentaram-se branco amarelados e de consistência friável, sendo esta última característica essencial para a produção de suspensões celulares, caso isso fosse desejado. Para todas as características avaliadas nesse experimento não se observou diferença significativa entre os tratamentos. Isto pode

ser explicado porque a água de coco contém sais minerais, citocininas, mio-inositol e nucleotídeos, sendo muito utilizada para estimular o crescimento de calos (CALDAS, HARIDASAN & FERREIRA, 1998).

Handa *et al.* (2005) verificaram que a água de coco é eficiente no estabelecimento e desenvolvimento de embriões de *Aniba rosaedora* Ducke. A indução e manutenção de calos utilizando água de coco também foram demonstradas por (BAUMERT, 1997);

RAJBHANDARI, STOMP, 1997; CAMARGO, 1997 citados por LANDA *et al.*, 2000).

A manutenção da cultura, no meio **MC1**, através da repicagem, durante 41 dias permitiu verificar que a partir do trigésimo terceiro dia os calos entraram em processo de oxidação sendo que por volta do quadragésimo primeiro dia se encontraram completamente oxidados. Landa *et al.* (2000) utilizando meio suplementado com água de coco verificou que esta não proporcionou um crescimento significativo em calos de *Caryocar brasiliense* Camb., quando comparado com os resultados obtidos com meio suplementado com ANA e BAP. Estes resultados estão em discrepância com os resultados obtidos no experimento I, uma vez que a BAP e o 2,4-D não influenciaram na resposta morfogenética dos explantes em meio de cultura. Além disso, Landa *et al.* (2000) verificaram que o meio quando suplementado com BAP, ANA e água de coco provocava a oxidação e/ou necrose dos explantes. No presente trabalho um outro fator que, provavelmente, influenciou a oxidação dos calos foi o fotoperíodo utilizado, porque de acordo com Creasy (1968 apud TEIXEIRA, 2001) as atividades das enzimas que provocam a oxidação são estimuladas pela luz.

Similarmente aos resultados obtidos com a utilização do meio **MC1**, o meio **MC2** influenciou a resposta morfogenética dos explantes inoculados. Após vinte dias da inoculação verificou-se o processo de diferenciação do tecido vegetal em calos. Pode-se verificar que os calos obtidos com a utilização do meio **MC2** sofreram um incremento, principalmente no tamanho nitidamente observado a olho nú, quando comparados com os calos obtidos no meio **MC1**. Neste caso, a ação do boro juntamente com a tiamina e o extrato de malte talvez tenha contribuído para o aumento no número de calos, embora Landa *et al.* (2000) tenham demonstrado que o extrato de malte não contribui para o aumento da matéria seca da espécie *Caryocar brasiliense* Camb.

Ainda com relação ao aumento do tamanho dos calos, Middleton *et al.* (1978 apud ONO, RODRIGUES, PINHO 1992) destacaram a importância do boro para o desenvolvimento dos mesmos assim como dos primórdios radiculares e posterior desenvolvimento das raízes. De acordo com Ono, Rodrigues e Pinho (1992) isso acontece porque, o boro interage com as auxinas, fato este demonstrado por estes autores estudando o enraizamento de estacas de *Coffea arábica* L. cv. Mundo novo e *Camellia japonica* L., respectivamente. Silva, Alquini, Cavallet (2005) que destacam ainda que a omissão do boro provoca, em tecidos meristemáticos, inibição da divisão e alongamento celular, assim como, desorganização de elementos vasculares em raízes.

Além disso, os calos obtidos no meio **MC2** apresentaram um percentual de oxidação menor, embora estatisticamente não significativo, que os calos inoculados no meio **MC1**. Provavelmente, isto esteja relacionado com a adição do boro ao meio de cultura.

De acordo com Pilbean & Kirkby (1983 apud TREVIZAM, 2005) o boro se liga aos fenóis (como o ácido cafeico) levando a formação de quinonas, o que facilita a síntese de precursores da biossíntese de lignina. Dessa forma, a deficiência de boro no meio de cultura pode levar ao acúmulo de fenóis provocando a fitotoxidez nos tecidos.

CONCLUSÕES

As diferentes combinações de BAP e 2,4 D utilizadas não foram adequadas para a micropropagação de ápices caulinares e segmentos nodais da sabiá, pelo menos quando esses são retirados da planta no estágio pós-frutificação e sob as condições climáticas a que as mesmas estavam submetidas (período seco).

No experimento II não houve diferença significativa, entre o meio de cultura a base de água de coco e mio-inositol (**MC1**) e o outro meio (**MC2**) acrescido de ácido bórico, tiamina e extrato de malte, no que se refere à indução de calo, mas foi visualmente evidente o incremento no tamanho dos mesmos no segundo meio testado.

O grau de oxidação dos explantes no meio **MC2** foi aparentemente menor que no **MC1**.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARELLO, E.F. **Aspectos gerais do comportamento *in vitro* de *Kielmeyera coriaceae* Martius (Guttiferae): produção e enraizamento de brotações.** 1991. 148p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

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**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 421 – 430, maio 2004.

ALVES, E. U et al. Dormência e desenvolvimento de sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.). **Revista Árvore**, v.28, n. 5, p. 655-662, 2004.

ARELLO, E.F. et al. Estabelecimento *in vitro* de explantes e regeneração de plântulas de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Book em cultura de tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n.2, fev. 1991.

BOMFIM, S.M; CAETANO, L.C. Obtenção das culturas de tecidos de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. 2003. Disponível em: <<http://www.propep.ufal.br/Eventos/1> Jornada

- Cientifica de Farmacia/Cronograma.htm.> Acesso em: 06 ago 2004.
- BHOJWANI, S.S.; MULLINS, K.; COHEN, D. Micropropagation of *Feijoa sellowiana* Berg. **Acta Horticulturae**, Belgium, n.212, p.69- 76, 1987.
- BLAKE, J. Tissue culture propagation of coconut, date and oil palm. In: DOODS, J.H. (Ed.). **Tissue culture of trees**. London: Croom Helm, 1983. p.23-50.
- BRUM, G. R. **Micropropagação da figueira (*Ficus carica* L.) 'Roxo de Valinhos'**. 2002.43p.:il.Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.
- 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: CBAB/EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 87-132. v.1.: il.
- CARVALHO, D. C. de et al.,Embriogênese somática do caqui. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.26, n.2, p.280-283. 2004.
- DANTAS, A. C. de M. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de cultivares de *pyrus spp*. **Revista Brasileira de Agrociência**. Pelotas, v.8, n.1, jan-abr, 2002.
- FERREIRA, M. das G. R. et al. Desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) em função da concentração de auxinas e do meio líquido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n.3, Dez. 2001.
- FROTA, H. M., M. S. de S. CARNEIRO, R. M. L. ZÁRATE, F. de A. P. CAMPOS & M. J. A. P. 2004. Efeitos do BAP e do AIA na indução e no crescimento *in vitro* de brotos de dez clones de palma forrageira. **Ciência Agrônômica**, 35 (n. esp.), 2004. p.279 – 283.
- GALSTON, A.W.; PURVES, W.K. The mechanism of action of auxin. **Annual Review of Plant Physiology**, v.11, p.239-276, 1960.
- GARCIA, J.; DUARTE, J. B. & FRASSETO, E. G. Superação de dormência em sementes de Sansão do campo (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.32, n. 1, p. 29-31. 2002.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2th ed. England: Exegetics Limited, 1996. 2v.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture, handbook and directory of commercial laboratories**. Everley: Exegetics, 1984. 709p.
- 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 Amazônica**. Manaus, v.35, n. 1, p.29-33, 2005.
- HARTMAN, T.H.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T. **Plant Propagation, Principles and practices**. Prentice Hall. New Jersey, 1990. 647 p.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 452p.: il.
- LANDA, F. de S. L. et al., Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência & Agrotecnologia**. Lavras, v.24 (Edição Especial), p.56-63, dez, 2000.
- LEAL JÚNIOR, G.; SILVA, J. A.da & CAMPELLO, R. C. **Proposta de manejo sustentado do sabiá**. Boletim Técnico 3, 1999. Projeto IBAMA/PNUD/BRA/93/033.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Platarum, 2000. v. 1. 351p.
- MENDES, B. V. **Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth)**: valiosa forrageira arbórea produtora de madeira das caatingas. ESAM – Mossoró, 1989.
- MULLINS, K.V. et al. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, v.16, p.787-791, 1997.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid grow and bio assays with tabacco tissue cultures.

Physiologia Plantarum, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. & PINHO, S. Z. do. Interações entre auxinas e ácido bórico no enraizamento de estacas caulinares de *Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo. **Scientia Agrícola**. Piracicaba, v.49 (Edição Especial), p. 23-27. 1992.

RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F. Propagação da macieira cv. gala através da cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.4, n.1, p.39-43, 1992.

SANTANA, R.A. de S.; ALLOUFA, M.A.I. Propagação *in vitro* da bananeira (*Musa* sp) cultivar Pacovan: efeito de várias concentrações de BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.3, p. 481-482, dez. 2000.

disponível

em:<http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/simposios/S-06>. Acesso em: 06 ago 2004.

THORPE, T. A., HARRY, I. S., KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. IN:DEBERGH, P. C., ZIMMERMAN, R. H.

TREVIZAM, R. **Análises histológicas e bioquímicas em calos de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake cultivados *in vitro* sob interação de boro e cálcio.** 2005. 167p.: il. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) Escola Superior de Agricultura Luis Queiroz, Piracicaba, 2005.

SERRANO, L. et al. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistics: complementary development of procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.285-290, 1996.

SILVA, L. M.; ALQUINI, Y. & CAVALLET, V. J. Inter relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta botânica brasileira**. São Paulo, v.19, n.1, p.183-194. 2005.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719p.: il.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas.** Brasília, 2001. **Micropropagation: technology and application.** Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 311-336.

TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A.. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** 1.ed. Brasília: EMBRAPA, 1998. 864p.: il.