

Ana Paula de Oliveira Ribeiro

**Influência de genótipo, agentes gelificantes,
precursor (ACC) e inibidores (AVG e STS) do
etileno e tipo de vedação na morfogênese *in vitro*
de berinjela (*Solanum melongena* L.)**

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

Viçosa
Minas Gerais - Brasil
2006

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

T

R484i
2006

Ribeiro, Ana Paula de Oliveira, 1977-

Influência de genótipo, agentes gelificantes, precursor (ACC) e inibidores (AVG e STS) do etileno e tipo de vedação na morfogênese *in vitro* de berinjela (*Solanum melongena* L.) / Ana Paula de Oliveira Ribeiro. Viçosa : UFV, 2006.
xii, 113f. : il. ; 29cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Berinjela. - Propagação *in vitro*. 2. Tecidos vegetais. - Cultura e meios de cultura. 3. Genética vegetal.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 635.6463

Ana Paula de Oliveira Ribeiro

**Influência de genótipo, agentes gelificantes,
precursor (ACC) e inibidores (AVG e STS) do
etileno e tipo de vedação na morfogênese *in vitro*
de berinjela (*Solanum melongena* L.)**

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

Aprovada em: 17 de março de 2006.

Prof. Sérgio Yoshimitsui Motoike
(Conselheiro)

Prof. Luiz Orlando de Oliveira

Prof. Aloisio Xavier

Prof. Marcio Gilberto Cardoso Costa

Prof. Wagner Campos Otoni
(Orientador)

Dedico

Aos meus familiares e amigos, todos, sem distinção, com todo o meu amor e sincero agradecimento pela paciência, força e tempo gastos comigo, colaborando para a construção desta pequena pessoa, e conseqüentemente, desta Tese.

Agradecimentos

A Deus sempre e por tudo!

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio concedido.

Ao meu orientador, Wagner Campos Otoni, difícil descrever tudo o que tenho que agradecer. Sempre preocupado e amigo, uma pessoa de coração bom (que se dedica a ajudar todos sempre). Crítico por natureza, mas sempre para o bem do ‘pobre’ criticado... Um excelente profissional, resumidamente: *Um modelo de pessoa!*

Aos meus colegas de Laboratório de Cultura de Tecidos (LCTII/BIOAGRO), Leonardo (Leozinho), Fabiana (Fabi), Maria Luiza (Malu), Letícia, Elisa, Takeshi, Ana Claudia, Felipe, Andréa, Samuel, Maurecilne, Miranda, Leandro, Lourdes, Silvano, Livia, Ana Paula, Daniela, Jaqueline por sempre me ajudar com os experimentos, trazer marmitas no momento de desespero, ter paciência, escutar minhas reclamações e delírios de felicidades (profissionais e pessoais). Por me fazer companhia e serem minha querida família Viçosense... *Vou sentir muita falta de vocês!!!*

À Elisonete Ribeiro Garcia Lani (Lili), por sempre estar disposta a ajudar, dar conselhos profissionais e pessoais. Uma grande amiga e excelente colega de trabalho. E, é claro, fazer parte da minha família Viçosense.

Ao Luciano Bueno dos Reis, por sempre me ajudar a resolver os bilhões e bilhões de problemas do meu computador, tirar as melhores fotos e, ainda, sempre me dar valiosas dicas em relação aos experimentos.

Aos meus conselheiros, os professores Sérgio Yoshimitsui Motoike, Derly José Henriques da Silva e Carlos Roberto de Carvalho pelas sugestões e conselhos durante a realização deste trabalho.

Ao professor Prof. Marcio Gilberto Cardoso Costa da UESC pelas sugestões e críticas e disponibilidade para vir participar da banca.

Aos membros da banca, professores Aloisio Xavier e Luiz Orlando de Oliveira pelas sugestões e críticas.

Ao Prof. Acelino Alfenas Couto pela disponibilização da lupa estereoscópica ao longo destes 4 anos, imprescindível para conduzir as avaliações do material.

Ao técnico José Maria, pelo zelo e cuidado para com as minhas plantas na casa de vegetação.

À Eunize Maciel Zambolim por ter cedido as instalações do Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, durante a condução de alguns experimentos.

Ao prof. Edgard Augusto de Toledo Picoli pelas sugestões, colaboração na confecção das lâminas e das fotos anatômicas.

Aos professores Paulo Roberto Cecon, Cosme Damião Cruz, Paulo Roberto Gomes Pereira, José Maria Moreira Dias, João Luiz Lani, Maria Catarina Migumi Kasuya e Mauricio Dutra Costa pelas sugestões, paciência e pela constante disponibilidade.

Aos funcionários da Genética e Melhoramento, Rita Rosado Cruz e Maria Conceição Lopes Vieira, e do Departamento de Biologia Vegetal, Ilza David e Ângelo Valentin, pela constante paciência e boa vontade na solução dos problemas burocráticos.

Aos colegas do BIOAGRO, Anna Rossi, Poliana, Andréia (sequenciamento), Raphael (café), André, Daniele (micorriza), pela colaboração e pelo excelente convívio.

Às minhas amigas Elisângela, Patrícia, Edna, Wanessa, Kledna, Maciana, Miriam, Raquel, Bárbara e aos colegas de curso Eduardo, Paulo Fernando, Samuel, Vander, Giselda, Isane, Ana Cristina, Flávia e Wellington pela amizade sincera e pelo carinho.

Às amigas Amélia, Solange, por sempre que possível ir ao laboratório para me fazer companhia, e ao Francis ler e corrigir, dar sugestões... E é claro, estarem sempre presentes, pela amizade sincera e pelo carinho...

Às amigas que dividiram apartamento comigo, Daniela, Francismar, Margarete e Ana Luisa pela paciência (afinal morar comigo não é fácil) e principalmente, pela amizade.

Ao Leonardo Ramos, pela paciência, tempo e energia perdidas comigo; lendo, corrigindo, sugerindo, fotografando, indo ao laboratório durante à noite, madrugada e nos finais de semana, retirando sementes de berinjela, tentando fazer meu computador funcionar direito, resumindo, fazendo pacientemente o possível para me ajudar.

Aos meus queridos familiares, Theodoro, Eliana, Enilce, Dinair, às ‘tias’, primos e primas pelo amor, estímulo, compreensão e eterna torcida...

A todas as pessoas que direta ou indiretamente, mencionadas ou não, contribuíram para a execução deste trabalho: **MUITO OBRIGADA!!!!**

Biografia

ANA PAULA DE OLIVEIRA RIBEIRO, filha de Paulo Custódio Ribeiro (*in memoriam*) e Eliana Aparecida de Oliveira Ribeiro, nasceu em Cássia, no Estado de Minas Gerais, em 18 de setembro de 1977.

Graduou-se em Licenciatura Plena no ano de 1999, e em Bacharelado no ano de 2000 pelo curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia. Participou do Grupo PET/BIOLOGIA-CAPES/UFU, de fevereiro de 1996 a janeiro de 2000. Sob a orientação do Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, conduziu monografia no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais – DEGEB/UFU, apresentada em 22 de dezembro de 1999.

Em março de 2000, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do Prof. Wagner Campos Otoni, concluindo em Março de 2002.

Em Abril de 2002, iniciou o doutorado em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa, com o mesmo orientador.

Conteúdo

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	07

Capítulo I

Estudo da divergência genética entre acessos de berinjela (*Solanum melongena* L.) do BGH-UFV baseado na capacidade morfogênica *in vitro*

RESUMO	11
INTRODUÇÃO	12
MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. Descrição do material vegetal	15
2.2. Germinação das sementes <i>in vitro</i> e condições de cultura	16
2.3. Explantes e meios de indução de embriogênese somática e de organogênese.....	16
2.4. Avaliação de acessos de berinjela (<i>Solanum melongena</i> L.) do BGH-UFV	17
2.5. Delineamento experimental	18
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

Capítulo II

Influência da concentração mineral do meio MS e de agentes gelificantes na morfogênese *in vitro* de berinjela (*Solanum melongena* L. ‘Embu’)

Resumo	33
Introdução	34
Material e Métodos	37
2.1. Obtenção do material vegetal, concentração de sais MS e de agentes gelificantes na germinação <i>in vitro</i>	37
2.2. Explantes, concentração de sais MS e de agentes gelificantes na embriogênese somática e organogênese	38
2.3. Concentração de sais MS no alongamento dos ápices caulinares	39
2.4. Teste de impureza e difusão de sais dos agentes gelificantes	39
2.5. Teores dos macro e micronutrientes nas plântulas e nos diferentes agentes gelificantes	39
2.6. Delineamento experimental	40
RESULTADOS	41
3.1. Influência da concentração de sais MS e de agentes gelificantes na morfogênese <i>in vitro</i>	41

3.2. Influência dos teores de macro e micro-elementos encontrados nas plântulas e agentes gelificantes	49
DISCUSSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

Capítulo III

Influência do precursor ACC e dos inibidores AVG e STS do etileno na morfogênese *in vitro* de berinjela (*Solanum melongena* L.)

RESUMO	64
INTRODUÇÃO	65
MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1. Obtenção do material vegetal e germinação <i>in vitro</i>	67
2.2. Indução de embriogênese somática e organogênese	68
2.2.1. Indução de embriogênese somática e organogênese em presença de inibidores de etileno (AVG e STS) e do precursor ACC	68
2.2.2. Retain [®] na embriogênese somática e organogênese	69
2.3. Critérios de avaliação e análise estatística	69
RESULTADOS	70
3.1. Efeito dos inibidores AVG e STS e do precursor ACC de etileno na embriogênese somática e organogênese	70
3.2. Efeito do Retain [®] na embriogênese somática e organogênese	776
DISCUSSÃO	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

Capítulo IV

Influência do tipo de vedação na morfogênese *in vitro* de berinjela (*Solanum melongena* L.)

RESUMO	88
INTRODUÇÃO	89
MATERIAL E MÉTODOS	92
2.1. Obtenção do material vegetal e germinação <i>in vitro</i>	92
2.2. Indução de embriogênese somática e organogênese	93
2.2.1. Tipos de vedação na morfogênese e multiplicação	93
2.3. Delineamento experimental	65
RESULTADOS	96
DISCUSSÃO	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
CONCLUSÕES GERAIS	113

Resumo

RIBEIRO, Ana Paula de Oliveira, D.S., Universidade Federal de Viçosa, março, 2006. **Influência de genótipo, agentes gelificantes, precursor (ACC) e inibidores (AVG e STS) do etileno e tipo de vedação na morfogênese *in vitro* de berinjela (*Solanum melongena* L.).** Orientador: Wagner Campos Otoni. Conselheiros: Sérgio Yoshimitsui Motoike, Derly José Henriques da Silva e Carlos Roberto de Carvalho.

No presente trabalho, estudos relacionados a aspectos da morfogênese e do comportamento *in vitro* de *Solanum melongena* foram realizados. Desse modo, objetivou-se determinar a influência do genótipo, concentração de sais e tipo de agente gelificante, inibidores da biossíntese e da ação e o precursor de etileno e tipo de vedação na morfogênese *in vitro*. Para tal, estudou-se a variabilidade genética entre 16 acessos de berinjela (*Solanum melongena* L.) do BGH-UFV, assim como do cultivar Embu, por meio da sua caracterização morfológica com base na resposta *in vitro*. A utilização do método de Tocher permitiu a formação de três grupos e seis subgrupos distintos. Avaliou-se os efeitos da concentração de sais do meio MS e de agentes gelificantes na germinação *in vitro* de sementes de berinjela e a capacidade de absorção dos nutrientes destas plântulas. Além de avaliar a influência do vigor de explantes obtidos destas mesmas plântulas na organogênese e embriogênese somática. Na germinação, observou-se o desenvolvimento de epicótilo e de folhas apenas nas plântulas desenvolvidas em meio MS força completa. No meio de indução de embriogênese, observou-se que o número de embriões formados em Agargel foi menor, enquanto que no meio de indução de organogênese, apenas a característica peso da matéria seca foi significativa. Para o alongamento de ápices caulinares, o melhor tratamento foi o meio contendo 50% dos sais MS. Pela determinação dos teores dos elementos nos agentes gelificantes detectou-se grande variação nos elementos químicos sendo que, para a maioria dos elementos a concentração foi menor no Ágar e maior no Phytigel. No teste de pureza foi observado que o Ágar foi o mais impuro, seguido pelo Agargel, e finalmente pelo

Phytigel[®]. Avaliou-se o efeito do etileno sobre a embriogênese somática e organogênese. Para tal, o meio foi suplementado com inibidores da biossíntese [(aminoetoxivinilglicina – AVG e de seu produto comercial ‘Retain[®]’ (Valent BioSciences Corporation, Illinois, EUA)] e da ação (tiosulfato de prata - STS) e, o precursor (ácido 1-aminociclopropano carboxílico – ACC) deste regulador. Observou-se pela equação de regressão que para a característica frequência de embriões, com a adição de ACC ao meio houve um aumento até próximo a 20 µM seguido de uma redução, enquanto que com adição de AVG obteve-se um ponto máximo em 3 µM, já na presença de STS houve uma queda. No meio indutor de organogênese, com o aumento da concentração do ACC e do AVG observou-se redução no peso da matéria fresca e na frequência de gemas, de ramos e de primórdios radiculares; além disso, resultou em aumento no diâmetro dos explantes. A suplementação de STS no meio induziu a um aumento na característica frequência de ramos e um decréscimo nas demais características. Ao se comparar os resultados obtidos com AVG e Retain[®], observou-se que houve diminuição nas características quando adicionado o Retain[®]. Avaliou-se, também, a influência do tipo de vedação nas características morfológicas de berinjela na indução de embriogênese somática, organogênese, assim como das características anatômicas e morfológicas no alongamento. Para avaliar o efeito da vedação, as placas foram vedadas com fita hipoalergênica (Micropore^{MR} 3M), Parafilm M (Sigma[®]) e filme plástico transparente de policloreto de vinila - PVC (Goodyear[®]). Os frascos foram vedados com PVC, tampa de polipropileno autoclavável (TSF) e a mesma tampa contendo dois filtros (TCF) de 10 mm de diâmetro e de 0,22 µm de poro (MilliSeal[®], Japão). Observou-se que as plântulas mantidas nos frascos vedados com TCF foram mais vigorosas. O tipo de vedação influenciou todas as características anatômicas estudadas, nas quais observou-se que um maior número de trocas gasosas está correlacionada com o grau de diferenciação dos tecidos. O número de estômatos e de células epidérmicas foi maior na face abaxial em todos os tratamentos de vedação.

Abstract

RIBEIRO, Ana Paula de Oliveira, D.S., Universidade Federal de Viçosa, March, 2006. **Influence of genotype, gelling agents, precursor (ACC) and inhibitors (AVG, STS) of ethylene, and of the type of sealing material in *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.).** Adviser: Wagner Campos Otoni. Committee members: Sérgio Yoshimitsui Motoike, Derly José Henriques da Silva and Carlos Roberto de Carvalho.

In the present work, studies related to aspects of the morphogenesis and of the behavior *in vitro* of *Solanum melongena* they were accomplished. This way, was aimed at to determine the influence of the genotype, of the salt concentration of and of the type of agent gelificante, of inhibitors of the biosynthesis and of the action and the ethylene precursor and of the type of sealing in the morphogenesis *in vitro*. For such, the genetic variability among 16 accessions of eggplant (*Solanum melongena* L.) from BGH-UFV was studied, as well as the cultivar Embu, by means of their morphological characterization based on the *in vitro* response. The utilization of the Tocher method allowed the formation of three groups and six different subgroups distincts. Both the effects of salt concentration of the MS medium and gelling agents in *in vitro* germination of eggplant seeds and the absorption capacity of the nutrients of these seedlings were evaluated. The influence of physiological conditions of explants obtained from these seedlings upon organogenesis and somatic embryogenesis was also evaluated. During germination, the development of epicotyl and leaves was observed only in the seedlings developed in full strength MS medium. In the medium of embryogenesis induction, it was observed that the number of embryos formed in Agargel (Sigma Chem. Co., USA) was smaller whereas only the characteristics weight and dry matter were significant in the organogenesis induction medium. For the elongation of shoot tips, the best treatment was the medium containing 50% of MS salts. Through the determination of content of the elements in the gelling agents, a great variation in the chemical elements was observed; for the majority of the elements, the concentration was lower in Agar (Merck, Germany) and

higher in Phytigel[®] (Sigma Chem. Co., USA). Concerning purity test, Agar proved to be the most impure, followed by Agargel and finally by Phytigel[®]. The effect of ethylene on the somatic embryogenesis and organogenesis was evaluated. In order to perform such evaluation, the medium was supplemented with inhibitors of biosynthesis [aminoethoxyvinylglycine - AVG (Sigma Chem. Co., USA), and its commercial product 'Retain[®]' (Valent BioSciences Corporation, Illinois, USA)] and action (silver thiosulphate - STS) and the precursor [1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid – ACC (Sigma Chem. Co., USA)] of the plant growth regulator. By means of regression equation, it was observed that for the parameter frequency of embryos, with the addition of ACC to the medium, there was an increase until about 20 μM , followed by a reduction, whereas a peak at 3 μM was obtained with the addition of AVG, on the other hand, a reduction was verified in the presence of STS. In the organogenesis inductor medium, with the increase of the concentration of ACC and AVG, a reduction in both the weight of fresh matter and the frequency of shoot buds was observed as well as a reduction of shoots and root primordia; Moreover, there was an increase in the diameter of the explants. The supplementation of STS in the medium led to a increase in the characteristic shoot frequency and a decrease in the other characteristics. By comparing the results obtained with AVG and Retain[®], it was observed a decrease in all the characteristics when Retain[®] was added. In addition, it was evaluated the influence of the type of sealing in the morphological characteristics of eggplant in the induction of somatic embryogenesis, organogenesis as well as the anatomical and morphological characteristics in elongation. In order to evaluate the sealing effect, the petri dishes were sealed with hypoallergenic tape (Micropore^{MR} 3M, Brazil), Parafilm M (Sigma Chem. Co., USA), and plastic film of Polyvinyl Chloride - PVC (Goodyear[®], Brazil). The flasks were sealed with PVC, autoclaved polypropylene closures (TSF) and the same closures containing two filters (TCF) of 10 mm in diameter and of 0.22 μm of pore (MilliSeal[®], Japan). It was verified that the seedlings kept in the flasks sealed with TCF were more vigorous. The type of sealing influenced all the anatomical characteristics analyzed in which it was observed that a higher amount of gas exchanges is correlated with the degree of tissue differentiation. The number of stomata and epidermis cells were greater in the abaxial face in all the sealing treatments.

Introdução Geral

A berinjela (*Solanum melongena* L.) pertence a família Solanaceae e é uma planta diplóide, com $2n=24$ (IKUTA, 1961). Geralmente, comporta-se como autógama, entretanto apresenta taxas de cruzamento natural da ordem de 5 a 6,75% (FILGUEIRA, 1982). A berinjela é utilizada como alimento e com fins medicinais, pois os frutos podem promover diminuição na taxa de colesterol do sangue e as folhas são usadas como cataplasmas em caso de queimaduras (KHAN, 1979).

Em muitos países da Ásia e África é considerada uma das hortaliças mais importantes, enquanto que no Brasil apresenta valor econômico crescente. Atualmente, um dos fatores limitantes a expansão da cultura de berinjela é a sua susceptibilidade a diversas pragas e patógenos (COLLONIER *et al.*, 2001). Esforços têm sido realizados no sentido da obtenção de variedades resistentes. A estratégia clássica para a obtenção de variedades resistentes, por meio da hibridação com espécies selvagens tem se mostrado inviável, uma vez que a maior parte dos híbridos interespecíficos são estéreis, o que impede o retrocruzamento e autopolinização (EVANS *et al.*, 1981).

Com o advento da biotecnologia, os melhoristas de plantas têm a disposição novas estratégias de transferência de genes. As técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas de diferentes maneiras no desenvolvimento de cultivares. Em geral, essas técnicas são utilizadas em uma ou outra etapa do melhoramento, pois oferecem novas alternativas aos programas de melhoramento em suas diferentes fases (FERREIRA *et al.*, 1998).

Nos últimos anos, muitos estudos da cultura de berinjela relacionados a aplicação da biotecnologia no melhoramento genético (COLLONIER *et al.*, 2001), tais como transformação genética via *Agrobacterium* (GURI e SINK, 1988), isolamento de protoplasto (GLEDDIE *et al.*, 1986) e embriogênese

somática (MAGIOLI *et al.*, 2001), têm sido relatados. Entretanto a existência de um eficiente sistema de regeneração *de novo* a partir de células, tecidos, ou órgãos vegetais é pré-requisito essencial para que a utilização destas modernas técnicas em biotecnologia possam ser aplicadas no auxílio do melhoramento genético (OTONI, 1995). Portanto, a cultura de tecidos é uma ferramenta promissora, contudo existem vários fatores que influenciam as respostas *in vitro* de um explante, tanto no tipo de expressão da morfogênese, quanto nos ritmos de proliferação (BROWN, 1988; MANTELL *et al.*, 1994).

Dentre os fatores que influenciam, FRANKENBERGER *et al.* (1981) demonstraram o efeito genético da regeneração em tomates, sendo que esta foi uma característica altamente herdável. Os mesmos autores verificaram a influência do tipo de explante, época do ano e condições do ambiente na qual as plantas cresceram. Baseado em cruzamentos recíprocos e análise de progênes quanto à capacidade de regeneração, OHKI *et al.* (1978) levantaram a importância da herança citoplasmática, e a influência do meio e explantes no desempenho de híbridos de tomate.

Num estudo da herança da habilidade de regeneração *in vitro* de tomate, FARIA e ILLG (1996) utilizaram *Lycopersicon pimpinellifolium* (genótipo WV-700), com alta capacidade de regeneração, como doador de pólen, em cruzamentos com cinco genótipos recalcitrantes de *L. esculentum*. A análise estatística foi baseada na frequência de calos que regeneraram plantas (R) na F₁, F₂, BC₁ e em cruzamentos recíprocos com genótipos que não regeneravam plantas (NR). Híbridos F₁ apresentaram um efeito de dominância, enquanto não foram observadas diferenças nos cruzamentos recíprocos. A razão encontrada na F₂ foi próxima a 9:7 (R: NR) e no BC₁, de 1:3 (R: NR). Os resultados sugerem a interação de dois genes dominantes, indicando que a transferência da alta capacidade de regeneração de uma variedade selvagem para uma comercial deve ser relativamente fácil, visto uma característica qualitativa estar envolvida.

WEBER *et al.* (2000) realizaram cruzamentos interespecíficos de espécies de *Helianthus* sp., verificando que a seleção de indivíduos superiores para respostas *in vitro* era dependente do genótipo. Nesse trabalho, foram selecionadas linhagens como sf2789/91 de *H. annuus* x *H. decapetalus* (DEC-Dij) e sf2803/91

de *H. annuus* x *H. strumosus* (STR-1974), que representam genótipos ideais para melhoramento e aplicações biotecnológicas por apresentarem características agronômicas favoráveis e alto potencial de regeneração *in vitro*.

GLEDDIE *et al.* (1983) verificaram a influência do genótipo no potencial embriogênico, a partir da avaliação de sete cultivares de berinjela. Observaram que, para explantes foliares da cultivar ‘Imperial Black Beauty’, o rendimento máximo de 19,2 embriões ocorreu com 10 mg L⁻¹ de ANA.

SAITO e NISHIMURA (1994) obtiveram embriões somáticos a partir de calos embriogênicos desenvolvidos de segmentos cotiledonares da cultivar ‘Nakate Shinkuro’, utilizando-se várias concentrações de 2,4-D e ANA. Entre as cultivares testadas de berinjela, a maioria desenvolveu embriões somáticos, enquanto o número de embriões formados diferiu entre as plantas doadoras. O tipo de vedação e a concentração de agentes gelificantes também influenciaram o desenvolvimento dos embriões.

SHARMA e RAJAM (1995) observaram que o genótipo, o explante e a interação entre eles determinaram efeitos significativos sobre o número de ramos regenerados entre as cultivares ‘Pusa Purple Long’, ‘Long White Cluster’, ‘Pusa Kranti’ e ‘Pusa Purple Cluster’ de berinjela. A posição também afetou a regeneração, os segmentos basais de hipocótilos produziram mais ramos, enquanto segmentos basais e apicais mostraram melhor potencial embriogênico.

Essas diferenças nas respostas dos diversos genótipos também foi observada em outras espécies, dentre estas pode-se citar: *Helianthus annuus* (BERRIOS *et al.*, 1999), *L. esculentum* (TAN *et al.*, 1987), *Solanum tuberosum* (FOULER e JONES, 1986) e *Vitis* sp. (REISCH, 1986).

Porém o efeito do genótipo na resposta *in vitro* pode ser reduzido quando as plantas são mantidas em condições mais próximas da *ex vitro*. Segundo NAVATEL e BOURRAIN (1994), a adição de vermiculita ao meio de cultura melhorou a taxa média de enraizamento e o efeito do genótipo entre os clones foi reduzido. Para melhorar estas condições pode-se modificar os outros fatores que influenciam a resposta *in vitro*, tais como o tipo de vedação.

As plantas quando no sistema de cultivo *in vitro* são mantidas em frascos fechados e a umidade dentro dos frascos é alta, o que conseqüentemente limita a

transpiração. Reduzindo a umidade nos frascos de cultivo, com um aumento no número de trocas gasosas, pode-se aumentar a absorção de água e minerais, assim como o transporte acrópeto de elementos do meio devido a uma maior transpiração (WILLIAMS, 1993; NGUYEN *et al.*, 1999).

As plântulas de *Eucalyptus camaldulensis* crescidas sob condições de alta troca gasosa exibiram estômatos normais e funcionais, alto conteúdo cutícula e transpiração controlada depois do transplante para condições *ex vitro*. Enquanto que as plântulas crescidas nas condições controle, sob pouca ou nenhuma troca gasosa, apresentaram muitos estômatos não-funcionais e menor deposição de cera epicuticular nas folhas (ZOBAYED *et al.*, 2001).

Um ambiente com trocas gasosas modifica as concentrações de CO₂ e O₂ (GONÇALVES, 2004) e evita o acúmulo de etileno. O etileno é um regulador de crescimento encontrado na forma gasosa, que embora não seja suplementado, acumula-se facilmente nos recipientes de cultura juntamente com outros compostos voláteis. Essa quantidade acumulada depende, primeiramente, da taxa de produção exibida pelos tecidos cultivados e do nível de trocas gasosas permitida pelos recipientes de cultura (REIS *et al.*, 2003).

O etileno afeta a morfogênese de diversas espécies, dentre estas pode-se citar: *Carica papaya* (MAGDALITA *et al.*, 1997), *Bixa orellana* (PAIVA-NETO, 2002), *Prunus persica* x *P. amygdalus* (DIMASI-THERIOU e ECONOMOU, 1995), *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (REIS *et al.*, 2003), *Phaseolus vulgaris* (CARVALHO *et al.*, 2000), dentre outras.

Além do ambiente gasoso, o meio de cultivo é um fator que influencia a resposta do explante. Esse possui nutrientes, reguladores de crescimento, agente gelificante entre outros, que possibilitam uma resposta adequada. Os nutrientes minerais são responsáveis por funções específicas no metabolismo, sendo que a deficiência ou o excesso pode comprometer as respostas morfogênicas (GEORGE, 1993).

Muitas espécies de plantas apresentam uma ampla tolerância a certos constituintes do meio de cultivo, porém não há padrão consistente descrito para cada espécie. Porém, o fornecimento de altas concentrações de minerais geralmente reduz o crescimento, provavelmente devido à toxidez (WILLIAMS,

1993). O efeito da variação dos componentes do meio (especialmente fontes de nitrogênio) enfatiza a importância de avaliações nutricionais assim como requerimentos hormonais nos estudos de morfogênese (GLEDDIE *et al.*, 1983).

A embriogênese somática em berinjela (*S. melongena*) foi influenciada pela composição dos sais do meio e o efeito observado pelos autores foi principalmente devido à relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, do que o nível total de nitrogênio (GLEDDIE *et al.*, 1983).

Além da concentração dos nutrientes o agente gelificante também influencia o estado físico do meio e esse por sua vez, modifica a difusão dos nutrientes e dos reguladores de crescimento (BORNMAN e VOGELMANN, 1984), enquanto que as interações químicas alteram a disponibilidade de substâncias solúveis. Dessa maneira, altas concentrações de gelrite no meio de regeneração e aumento de trocas gasosas nos frascos de cultivo levaram a um desenvolvimento normal de embriões somáticos de berinjela (SAITO e NISHIMURA, 1994).

Solanum melongena é uma espécie de interesse crescente, no qual vários estudos *in vitro* foram realizados (COLLONNIER *et al.*, 2001; KASHYAP *et al.*, 2003), objetivando melhorar e entender como ocorre a resposta *in vitro*. Foram determinadas: a influência do genótipo (SAITO e NISHIMURA, 1994; SHARMA e RAJAM, 1995), TDZ (MAGIOLI *et al.*, 1998), poliaminas (YADAV e RAJAM, 1997), antibióticos (BILLINGS *et al.*, 1997; PICOLI *et al.*, 2000; PICOLI e OTONI, 2001). Estudou-se também as respostas de vários explantes em diferentes meios, dentre esses: cotilédones (PICOLI e OTONI, 2001), hipocótilos (PICOLI, 2000; PICOLI *et al.*, 2001), folhas (GLEDDIE *et al.*, 1983), raízes (FRANKLIN *et al.*, 2004) e micrósporos (MIYOSHI, 1996).

Essa gama de estudos foi possibilitada devido à facilidade de se obter respostas *in vitro* nessa espécie, porém estudos envolvendo a influência de promotores e inibidores do etileno e de agentes gelificantes não foram relatados. Desse modo, o protocolo de morfogênese *in vitro* pode ser melhorado e otimizado e a resposta morfogênica melhor compreendida, com a inclusão dessas abordagens.

No presente trabalho estudos relacionados a aspectos da morfogênese e do comportamento *in vitro* de *Solanum melongena* foram realizados, buscando fatores que interferem no cultivo *in vitro*. Desse modo, objetivou-se determinar a influência do genótipo (a partir de caracterização morfológica com base na resposta morfogênica *in vitro*), da concentração de sais e do tipo de agente gelificante, de inibidores da biossíntese (AVG e seu produto comercial Retain[®]) e da ação (STS) e o precursor (ACC) de etileno e do tipo de vedação na morfogênese *in vitro*.

Referências Bibliográficas

- BERRIOS, E.F., L. GENTZBITTEL, H. SERIEYS, G. SALIBERT, A. SARRALI. 1999. Influence of genotype and gelling agents on *in vitro* regeneration by organogenesis in sunflower. *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.* 59:65-69.
- BILLINGS, S., G. JELENKOVIC, C.K. CHIN, J. EBERHARDT. 1997. The effect of growth regulators and antibiotics on eggplants transformation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122:158-162.
- BORNMAN, C.H., T.C. VOGELMANN. 1984. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 61:505-512.
- BROWN, D.C.W. 1988. Germoplasm determination of *in vitro* somatic embryogenesis in Alfalfa. *HortScience* 23:526-531.
- CARVALHO, M.H.C., B.V. LE, Y. ZUILY-FODIL, A.T.P. THI, K.T.T. VAN. 2000. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Sci.* 159:223-232.
- COLLONIER, C., I. FOCK, V. KASHYAP, G.L. ROTINO, M.C. DAUNAY, Y. LIAN, I.K. MARISKA, M.V. RAJAM, A. SERVAES, G. DUCREUX, D. SIHACHAKR. 2001. Applications of biotechnology in eggplant. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 65:91-107.
- DIMASI-THERIOU, K., A.S. ECONOMOU. 1995. Ethylene enhances shoot formation in cultures of the peach rootstock GF-677 (*Prunus persicae* x *P. amygdalus*). *Plant Cell Rep.* 15:87-90.
- EVANS, D.A., W.R. SHARP, C.E. FLICK. 1981. Growth and behaviour of cell cultures: embryogenesis and organogenesis, p. 45-113, *In* T. A. THORPE, ed. *Plant Tissue cell culture: methods and applications in agriculture*. Academy press, Now York.
- FARIA, R.T., R.D. ILLG. 1996. Inheritance of *in vitro* plant regeneration ability in the tomato. *Rev. Braz. Genet.* 19:113-116.

FERREIRA, M.E., L.S. CALDAS, E.A. PEREIRA. 1998. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas, p. 21-44, *In* A. C. TORRES, et al., eds. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, vol. I. Serviço de Produção de Informação - SPI, Brasília, DF.

FILGUEIRA, F.A.R. 1982. Manual de olericultura, cultura e comercialização de hortaliças Agronômica CERES, São Paulo, SP.

FOULGER, D., M.G.K. JONES. 1986. Improved efficiency of genotype-dependent regeneration from protoplasts of important potato cultivars. *Plant Cell Reports* 5:72-76.

FRANKENBERGER, E.A., P.M. HASEGAWA, E.C. TIGHELAAR. 1981. Diallel analysis of shoot forming capacity among selected tomato genotypes. *Z. Pflanzenphysiol.* 102:233-242.

FRANKLIN, G., C.J. SHEEBA, C. LAKSHMI SITA. 2004. Regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.) from root explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 40:188-191.

GEORGE, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. 2 ed. Exegetics Limited, Edington, England.

GLEDDIE, S., W. KELLER, G. SETTERFIELD. 1983. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *Solanum melongena* (eggplant). *Can. J. Bot.* 61:656-666.

GLEDDIE, S., W.A. KELLER, G. SETTERFIELD. 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension derived protoplasts of *Solanum melongena* (eggplant). *Can. J. Bot.* 64:355-361.

GONÇALVES, L.A. 2004. *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae): anatomia, citogenética, citometria de fluxo e propagação *in vitro*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

GURI, A., K.C. SINK. 1988. *Agrobacterium* transformation of eggplant. *J. Plant Physiol.* 133:52-55.

IKUTA, H. 1961. Vigor híbrido na geração F1 em berinjela (*S. melongena*), ESALQ, Piracicaba, SP.

KASHYAP, V., S.V. KUMAR, C. COLLONIER, F. FUSARI, R. HAICOUR, G.L. ROTINO, D. SIHACHAKR, M.V. RAJAM. 2003. Biotechnology of eggplant. *Sci. Hort.* 97:1-25.

KHAN, R. 1979. *Solanum melongena* and its ancestral forms, p. 629-636, *In*: J. HAWKES, et al., eds. The biology and taxonomy of the Solanaceae.

MAGDALITA, P.M., I.D. GODWIN, R.A. DREW, S.W. ADKINS. 1997. Effect of ethylene and culture environment on development of papaya nodal cultures. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 49:93-100.

MAGIOLI, C., A.P.M. ROCHA, D.E. OLIVEIRA, E. MANSUR. 1998. Efficient shoot organogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.) induced by thidiazuron. *Plant Cell Rep.* 17:661-663.

MAGIOLI, C., R.M. BARRÔCO, C.A.B. ROCHA, L.D. SANTIAGO-FERNANDES, E. MANSUR, G. ENGLER, M. MARGIS-PINHEIRO, G. SACHETTO-MARTINS. 2001. Somatic embryo formation in *Arabidopsis* and eggplant is associated with expression of a glycine-rich protein gene (*Atgrp-5*). *Plant Sci.* 161:559-567.

MANTELL, S.H., J.A. MATTHEWS, R.A. McKEE. 1994. Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas. F. A. M. Duarte ed. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP.

MIYOSHI, K. 1996. Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Rep.* 15:391-395.

NAVATEL, J.C., L. BOURRAIN. 1994. Influence of the physical structure of the medium on *in vitro* rooting. *Adv. Hort. Sci.* 8:57-59.

NGUYEN, Q.T., T. KOZAI, U.V. NGUYEN. 1999. Effects of sucrose concentration, supporting material and number of air exchanges of the vessel on the growth of *in vitro* coffee plantlets. *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.* 58:51-57.

OHKI, S., C. BIGOT, J. MOUSSEAU. 1978. Analysis of shoot-forming capacity *in vitro* in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and their hybrids. *Plant Cell Physiol.* 19:27-42.

OTONI, W.C. 1995. Hibridação e embriogênese somática e transformação genética em espécies de *Passiflora*. Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PAIVA-NETO, V.B. 2002. Morfogênese *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PICOLI, E.A.T. 2000. Morfogênese *in vitro* e transformação genética de berinjela (*Solanum melongena* L. cv. Embu) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PICOLI, E.A.T., W.C. OTONI. 2001. Morfogênese *in vitro* em berinjela influenciada por higromicina e períodos de exposição em ANA. *Ciênc. Agrotec.* 25:1474-1481.

PICOLI, E.A.T., W.C. OTONI, P.R. CECOM, M. FÁRI. 2000. Influence of antibiotics on NAA-induced somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L. cv. Embu). Int. J. Hortic. Sci. 6:88-95.

PICOLI, E.A.T., W.C. OTONI, M.L. FIGUEIRA, S.M.B. CAROLINO, R.S. ALMEIDA, E.A.M. SILVA, C.R. CARVALHO, E.P.B. FONTES. 2001. Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). Plant Sci. 160:857-868.

REIS, L.B., V.B. PAIVA-NETO, E.A.T. PICOLI, M.G.C. COSTA, M.M. RÊGO, C.R. CARVALHO, F.L. FINGER, W.C. OTONI. 2003. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant 39:618-622.

REISCH, B.I. 1986. Influence of genotype and cytokinins on *in vitro* shoot proliferation of grapes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111:138-141.

SAITO, T., S. NISHIMURA. 1994. Improved culture conditions for somatic embryogenesis using an aseptic ventilative filter in eggplant (*Solanum melongena* L.). Plant Sci. 102:205-211.

SHARMA, P., M.V. RAJAM. 1995. Genotype, explant and position effects on organogenesis and somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). J. Exp. Bot.46:135-141.

TAN, M.M.C., C.M. COLIJN-HOOYMANS, W.H. LINDHOUT, A.J. KOOL. 1987. A comparison of shoot from protoplasts and leaf discs of different genotypes of the cultivated tomato. Theor. Appl. Genet. 75:105-108.

WEBER, S., R. HORN, W. FRIEDT. 2000. High regeneration potential *in vitro* of sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines derived from interspecific hybridization. Euphytica 116:271-280.

WILLIAMS, R.R. 1993. Mineral nutrition *in vitro* - a mechanistic approach. Aust. J. Bot. 41:237-251.

YADAV, J.S., M.V. RAJAM. 1997. Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of *Solanum melongena* L. associated with differential morphogenetic capacity: efficient somatic embryogenesis with putrescine. J. Exp. Bot. 48:1537-1545.

ZOBAYED, S.M.A., F. AFREEN, T. KOZAI. 2001. Physiology of Eucalyptus plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant 37:807-813.

Capítulo I

Estudo comparativo da capacidade de respostas *in vitro* de acessos de berinjela (*Solanum melongena* L.) do BGH-UFV

RESUMO

O objetivo do trabalho foi estudar a variabilidade genética entre 16 acessos de berinjela do BGH-UFV, assim como do cultivar Embu (Horticeres[®]), por meio da sua caracterização morfológica com base na resposta *in vitro*. As sementes foram desinfestadas e inoculadas em meio MS, acrescido de vitaminas B₅, 100 mg L⁻¹ de inositol e 2% de sacarose e solidificado com 6,5 gL⁻¹ de Ágar Merck[®]. Os cotilédones ou os hipocótilos foram utilizados como fonte de explantes e inoculados em meio MS como descrito anteriormente, acrescido de 10 mg L⁻¹ de ANA (embriogênese) ou 0,1 mg L⁻¹ de AIA (organogênese), respectivamente. As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 h, temperatura de 26 ± 2°C e irradiância de 38 μmol m⁻² s⁻¹. Pela ANOVA foi detectada diferença estatística significativa para 27 das 32 características em estudo. O número de raízes (Nraiz) formado foi maior no BGH-2447 e menor no BGH-2505. O número de ramos (NR) formado foi maior em ‘Embu’, em conjunto com o BGH-0629, BGH-2755 e BGH-2774, estes acessos foram significativamente superiores aos demais acessos. No meio indutor de embriogênese, observou-se que em relação à característica número de embriões (NET), os melhores acessos foram BGH-2404, ‘Embu’ e BGH-0908, sendo os outros significativamente inferiores. De acordo com as estimativas de distância generalizada de Mahalanobis, observou-se que a menor distância obtida foi entre os acessos BGH-0629 e BGH-0908. Enquanto a maior distância foi observada entre os acessos BGH-0312 e BGH-2404. A utilização do método de Tocher permitiu a formação de três grupos e seis subgrupos.

Palavras-chave: análise de agrupamento, embriogênese somática e organogênese.

INTRODUÇÃO

As técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de novos cultivares de plantas. Trata-se, portanto, de alternativas aos programas de melhoramento em suas diferentes fases. Quando se pensa em melhoramento genético, a introgressão gênica, resgate de embriões, e ainda, a incorporação de genes via transformação genética, são exemplos dependentes das técnicas de cultura de tecidos (FERREIRA *et al.*, 1998). Porém, para várias espécies a regeneração *in vitro* é muitas vezes esporádica e transitória, e em muitos casos somente uns poucos genótipos respondem favoravelmente às condições indutivas de morfogênese (MANTELL *et al.*, 1994).

No desenvolvimento de cultivares, o fitomelhoramento prima pela fixação de genes, preferencialmente associados às características de interesse agrônomo. Dessa maneira, cultivares comerciais podem apresentar grande variabilidade e baixa frequência de resposta *in vitro* devido à ausência de seleção a favor da resposta morfogênica (MARBACH, 1998).

Na implantação de um programa de melhoramento, um dos principais objetivos é o conhecimento do germoplasma disponível e a posterior capacidade de identificar plantas de uma progênie segregante que possua genes de interesse. Desta maneira, estudos de avaliação e caracterização da resposta *in vitro* são importantes para posterior identificação de genes e novos cultivares com alta frequência de regeneração.

O conhecimento de genótipos com alta frequência de regeneração *in vitro* facilita os estudos. Deste modo, genes essenciais para as respostas morfogênicas, suas funções e interações que ocorrem entre os diversos genes e o meio de cultivo são compreendidos. Assim, melhoristas podem utilizar-se desse conhecimento e, ainda, da tecnologia do DNA recombinante, para a obtenção de variedades com características de interesse que não são obtidas pelo melhoramento convencional.

A variabilidade genética observada é resultado da presença de diversos genes e alelos em combinações diferentes nos vários genótipos e sua interação com o ambiente (NASS, 2001). Apesar do crescente aumento, pouco ainda é conhecido sobre a função dos genes associados a respostas *in vitro*, bem como porque apresentam expressão diferencial nos processos morfogênicos.

A importância do isolamento de genes preferencialmente expressos em estádios específicos da embriogênese e sua posterior caracterização funcional no desenvolvimento foram destacadas por SUNG *et al.* (1988). Estudos dessa natureza podem auxiliar o entendimento e a sobreposição da recalcitrância de algumas espécies.

O potencial de regeneração de alfafa tetraplóide foi aumentado de 12 para 67% em dois ciclos de seleção recorrente (BINGHAM *et al.*, 1975). Segundo os autores, o aumento rápido na frequência de regeneração indica que o potencial de regeneração é altamente herdável.

Ampla variabilidade de respostas *in vitro* foi relatada em cultivares de *Medicago sativa*, desde baixo a elevado potencial de regeneração (MITTEN *et al.*, 1984). Nessa mesma direção, BECKERT E QING (1984) detectaram considerável variação genética para as características de cultivo *in vitro* em *Zea mays* (formação de brotos, formação de raiz e mais especificamente, crescimento de calo), sendo estas passíveis de melhoramento para a aptidão de cultivo *in vitro*.

A análise de segregação revelou que características favoráveis de cultura de células e capacidade de regeneração de *L. peruvianum* eram dominantes e controladas por dois genes. Um gene controlando a regeneração de ramos foi adicionalmente mapeado no cromossomo 3 de *L. peruvianum* (KOORNNEEF *et al.*, 1987, 1993). Outro trabalho relatou o desenvolvimento de uma linhagem especial de tomate com alta capacidade de regeneração, MsK93, resultado de um retrocruzamento de híbridos de *L. peruvianum* x *L. esculentum* com *L. esculentum* cv. VF11 (KOORNNEEF *et al.*, 1986). Os genótipos MKS8 e MKS9 foram selecionados de outros retrocruzamentos de MKS93 com VF11. Esses genótipos foram selecionados com base em sua eficiente capacidade de regeneração de ramos a partir de protoplastos ou cultura de calos. Esse material foi de extrema importância para o sucesso de experimentos de transformação genética, incluindo

aqueles que envolve transformação direta de protoplastos ou de discos foliares mediata por *Agrobacterium*, reforçando a importância do genótipo para manipulação genética.

Em tomateiro, a habilidade regenerativa é controlada por dois genes independentes, sendo relativamente fácil introgridir a capacidade de regeneração de *Lycopersicon pimpinellifolium* (genótipo WV-700) para variedades comerciais de *L. esculentum*, para maximizar as respostas *in vitro* dessas plantas (FARIA e ILLG, 1996).

Em berinjela, o genótipo, o explante e a interação genótipo-explante têm efeito significativo quando induzido organogênese e embriogênese somática. Sendo que, 'Pusa Purple Long' foi o genótipo mais responsivo para ambos, entre os cultivares estudados (SHARMA e RAJAM, 1995).

É importante ressaltar que, berinjela é um vegetal economicamente importante em muitos países na Ásia e África, frequentemente tem um nível insuficiente de resistência a várias doenças e pragas. Cruzamento com espécies selvagens tem sucesso limitado devido à incompatibilidade sexual. Contudo, a habilidade de berinjela para responder bem a cultura de tecidos, notavelmente a regeneração, tem permitido a aplicação da biotecnologia para a transferência de genes (COLLONIER *et al.*, 2001).

Contudo, a variação genotípica nas respostas *in vitro* tem limitado o sucesso e a aceitação da cultura de tecidos como ferramenta útil para a pesquisa e melhoramento de plantas (BROWN, 1988). Dessa maneira, um pré-requisito para a aplicação das técnicas e cultura de tecidos é a maior disponibilidade de germoplasma responsivo e linhas melhoradas que podem ser manipuladas *in vitro*.

Desse modo, o objetivo do trabalho foi estudar a variabilidade genética entre 16 acessos de berinjela do Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa (BGH-UFV) assim como do cultivar Embu, por meio da sua caracterização morfológica com base na resposta *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Descrição do material vegetal

Sementes de berinjela (*Solanum melongena* L. ‘Embu’) Horticeres[®], adquiridas no comércio local, e de 16 acessos do Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa (BGH-UFV) foram utilizadas nos experimentos (Tabela 1).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II, no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Tabela 1. Resumo dos dados de passaporte de 16 acessos de berinjela (*Solanum melongena* L.) do BGH-UFV e do cultivar Embu.

Referência	Acesso	Local da Coleta
1	‘Embu’	Horticeres [®]
2	BGH-0312	Brasília, DF
3	BGH-0629	São João Del Rei, MG
4	BGH-0906	Campinas, SP
5	BGH-0908	Campinas, SP
6	BGH-2404	Taiwan, República da China
7	BGH-2447	Taiwan, República da China
8	BGH-2505	Copenhaguen, Dinamarca
9	BGH-2541	Parma, Itália
10	BGH-2579	Whithan Essex, Inglaterra
11	BGH-2637	Haifa, Israel
12	BGH-2754	Nova Delhi, Índia
13	BGH-2755	Nova Delhi, Índia
14	BGH-2756	Nova Delhi, Índia
15	BGH-2757	Nova Delhi, Índia
16	BGH-2774	Nova Delhi, Índia
17	BGH-5991	Igarapé, MG

2.2. Germinação das sementes *in vitro* e condições de cultura

As sementes foram embebidas por 72 horas em água deionizada e estéril, submetidas à desinfestação a cada 24 horas, ao longo deste período. Neste processo, foram imersas em álcool 70% por 1 minuto, seguido por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio (Brilhante[®]) a 2,5 % acrescido de 2 gotas de Tween 20 para cada 100 mL de solução e enxaguadas em água deionizada e estéril três vezes seguidas (PICOLI, 2000).

Posteriormente, as sementes foram inoculadas em meio composto de sais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) completo, acrescido de vitaminas B₅ (GAMBORG et al., 1968), 100 mg L⁻¹ de inositol e 2% de sacarose, solidificado com 6,5 g L⁻¹ de Ágar Merck[®] (*Agar-agar purified and free for microbiology* – Merck KgaA, Germany), com o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C e a 1 atm durante 20 minutos. Foram distribuídos 40 mL de meio de cultivo em cada frasco de vidro (12 cm de altura e 6 cm de largura) e cerca de 10 sementes foram inoculadas por recipiente.

As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 26 ± 2°C e irradiância de 37 ± 4 μmol m⁻² s⁻¹ (lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil).

2.3. Explantes e meios de indução de embriogênese somática e de organogênese

De oito a dez cotilédones ou hipocótilos provenientes de plântulas com aproximadamente 15 dias, obtidas como descrito no item 2.2 foram utilizados como fonte de explantes para embriogênese ou organogênese, respectivamente. Os cotilédones foram seccionados longitudinalmente e inoculados em meio de cultivo com a face abaxial voltada para o meio de cultivo. Segmentos de hipocótilo com cerca de 1 cm de comprimento foram inoculados em meio de cultivo seguindo a orientação base-ápice.

O meio composto de sais MS acrescido de vitaminas B₅, 100 mg L⁻¹ de inositol, 2% de sacarose, 6,5 g L⁻¹ de Ágar[®] (Merck) foi utilizado. Acrescentou-se como regulador de crescimento 10 mg L⁻¹ de ANA (ácido α -naftaleno acético) ou 0,1 mg L⁻¹ de AIA (ácido indolacético) nos meios para indução de embriogênese ou organogênese, respectivamente. Ressalta-se que o ANA foi adicionado antes da autoclavagem, e o AIA após sua filtro-esterilização e adição ao meio durante o resfriamento deste. O pH foi ajustado para 5,8 e o meio vertido em placas de Petri estéreis de 9 cm de diâmetro e 1,2 cm de altura.

As placas foram mantidas sob as condições de fotoperíodo, temperatura e irradiância descritas no item 2.2.

2.4. Avaliação de acessos de berinjela (*Solanum melongena* L.) do BGH-UFV

Com o objetivo de determinar as respostas morfogênicas e agrupar os acessos, foram avaliados aos 30 dias os seguintes parâmetros:

1) No meio de indução de organogênese: número de primórdios radiculares induzidos nos hipocótilos (Nraiz); número de ramos (NRam); número de gemas (NG); peso do explante (Peso O); percentagem de explantes que regeneraram (PER); percentagem de explante hiperhídricos (PEH); intensidade de calejamento (IC); consistência de calejamento (CC); posição de lançamento de órgãos adventícios (POA). O calejamento foi classificado com notas: 1 = baixa; 2 = mediana e 3 = alta; para consistência do calejamento: 1 = friável; 2 = compacto e 3 = calos com setores friáveis e setores compactos; e para posição de lançamento de órgãos adventícios: 1 = extremidade; 2 = meio; 3 = formação em ambas as regiões.

2) No meio de indução de embriogênese somática: peso do explante (Peso E); percentagem de calo coloração branca (CorCb); percentagem de calo com coloração amarelada (CorCa); percentagem de calo com coloração esverdeada (CorCv); percentagem de calo com coloração marrom (CorCm); percentagem de explantes com ausência de calejamento (CorCaus); percentagem de calos com consistência friável (ConsCf); percentagem de calos com consistência compacta

(ConsCc); percentagem de calo com setores friáveis e setores compactos (ConsCfc); percentagem de calo com ausência de calejamento (ConsCAus); intensidade de calejamento baixa (IntCb); intensidade de calejamento mediana (IntCm); intensidade de calejamento alta (IntCa); ausência de calejamento (IntCaus); número de embriões total (NET); embriões localizados na superfície do calo (LocE S); embriões localizados no interior do calo (LocE I); embriões localizados na superfície e no interior do calo (LocE SI); ausência de embriogênese (LocE Aus); número de primórdios radiculares (NPR); presença de necrose (Nec); presença de oxidação (Oxid); e número de brotos (Nbroto).

2.5. Delineamento experimental

Os dados deste trabalho referem-se a duas repetições experimentais, seguiram o delineamento inteiramente casualizados (DIC) os quais foram submetidos á análise de variância (ANOVA). Para a comparação entre as médias dos tratamentos foi realizado o teste de Tukey a 5% de significância para todos os experimentos.

A divergência genética entre os acessos foi estudada por meio da análise de agrupamento de Otimização de Tocher, utilizando-se a distância generalizada de Mahalanobis. Todas as análises foram realizadas também com o auxílio do programa estatístico GENES, versão WINDOWS/2004.2.1, desenvolvido por CRUZ (2001).

RESULTADOS

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) das 32 características avaliadas nos acessos de berinjela. Por esta análise foi detectada a existência de diferenças significativas, a 5% de probabilidade pelo teste F, entre os 17 tratamentos, por meio da análise de variância univariada, para 27 das 32 características em estudo.

Tomando-se por base a significância dos quadrados médios na análise de variância individual, foi avaliado o desempenho das médias dos 17 tratamentos (16 acessos e a cultivar Embu), por característica pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Para o teste de médias foram selecionadas as características no meio contendo 0,1 mg L⁻¹ de AIA: número de gemas (NG); número de ramos (NR); e números de raízes (NRaiz). Enquanto que no meio contendo 10 mg L⁻¹ de ANA foram determinadas as características: número de embriões (NET) e números de raízes (NPR).

Desse modo, observou-se que quando os hipocótilos foram cultivados em meio MS suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de AIA, a resposta morfogênica variou entre os tratamentos. O número de raízes (Nraiz) formadas foi maior no BGH-2447 e menor no BGH-2505. Os acessos restantes apresentaram valores intermediários diferindo ou não do maior e do menor valor observado (Figura 1).

O número de ramos (NR) formados foi maior em 'Embu', em conjunto com o BGH-0629, BGH-2755 e BGH-2774, estes acessos foram significativamente superiores aos demais acessos (Figura 1).

O número de gemas (NG) foi significativamente menor nos acessos BGH-0629, BGH-2505, BGH-2754, BGH-2757, BGH-5991 e 'Embu' dos demais acessos (Figura 1).

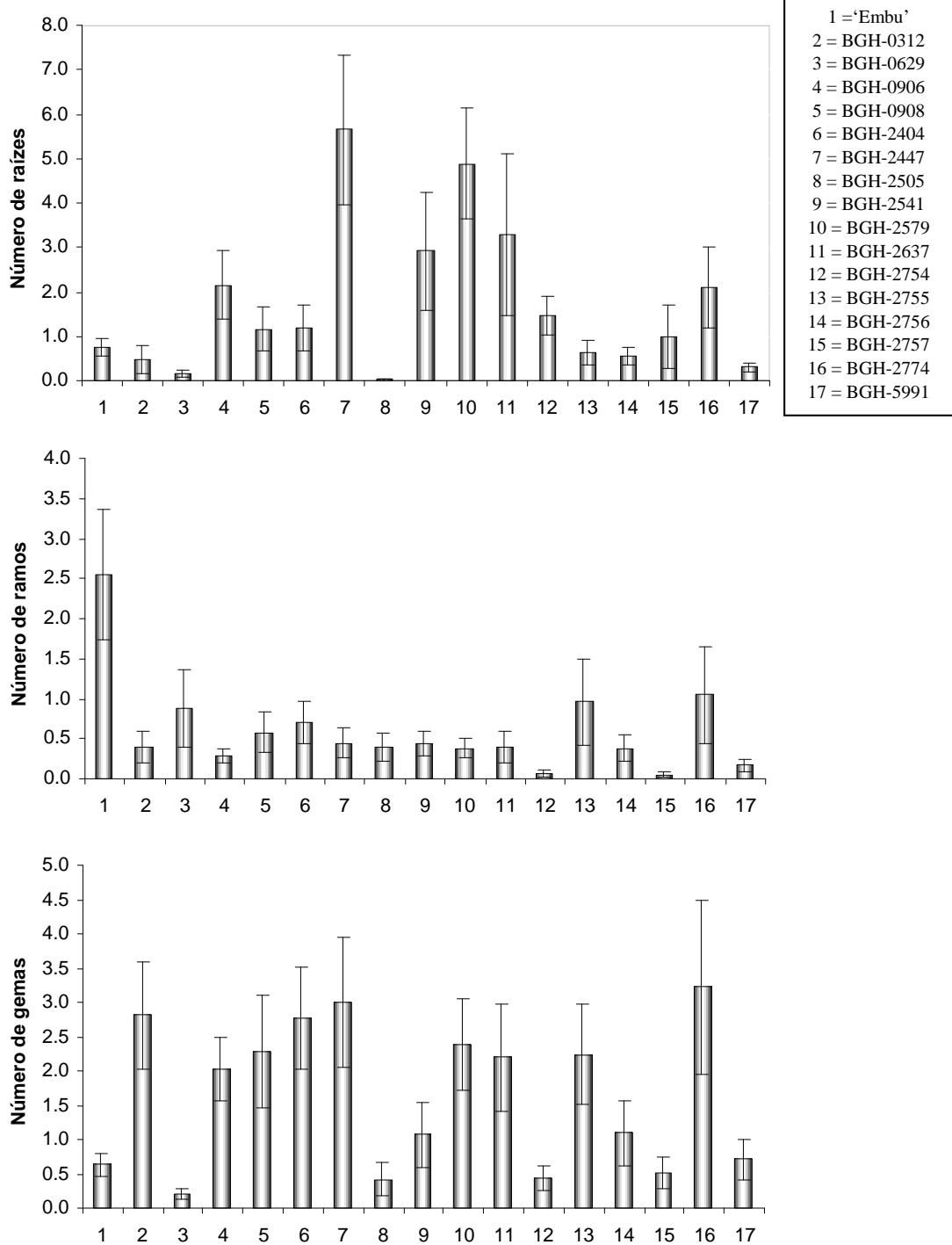


Figura 1. Resposta morfogênica dos diferentes acessos de berinjela do BGH-UFV, quando os explantes foram mantidos em meio MS suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de AIA. As barras verticais indicam os erros padrões da média.

Quando os cotilédones foram cultivados em meio MS acrescido de 10 mg L⁻¹ de ANA, observou-se que em relação a característica número de embriões (NET), os melhores acessos foram BGH-2404, ‘Embu’ e BGH-0908, sendo os outros significativamente inferiores. Quanto à característica número de raízes (NPR) formadas no meio contendo 10 mg L⁻¹ de ANA, observou-se que os acessos significativamente menores foram BGH-0312, BGH-0629, BGH-2505, BGH-5991 e ‘Embu’(Figura 2).

Foi observada uma alta variabilidade nas respostas, dentre as quais se observou acessos com grande número de raízes, já outros com grande número de embriões, além de variação na intensidade e no tipo de calejamento (Figuras 3 e 4).

Em relação a organogênese, as respostas também se mostraram diversas, com a observação de calejamento tanto altos como baixos nos acessos estudados. Em alguns tratamentos visualizou-se longos brotos e raízes, já em outros não houve formação de um, de outro ou ainda de ambos, assim como, observou-se alguns brotos pequenos (Figuras 3 e 5).

De acordo com as estimativas de distância generalizada de Mahalanobis, observou-se que a menor distância obtida foi entre os acessos BGH-0629 e BGH-0908, coletados em São João Del Rei (MG) e Campinas (SP), respectivamente. Enquanto a maior distância foi observada entre os acessos BGH-0312 e BGH-2404, coletados em Brasília (DF, Brasil) e Taiwan (China), respectivamente.

A utilização do método de Tocher permitiu a formação de três grupos, sendo que dois foram compostos de dois acessos e um desses foi constituído por 13 acessos. Este grupo foi dividido em 6 subgrupos, sendo que um grupo continha 3 acessos, outro 5 acessos, outro dois acessos e o restante dos subgrupos constituídos de um acesso (Tabela 4).

As características que mais contribuíram para a divergência genética entre os acessos de berinjela foram intensidade de calejamento alto (IntCa) e média (IntCm); e percentagem de calos com coloração marrom (CorCm), enquanto os que menos contribuíram para a divergência foram percentagem de explantes que regeneraram (PER), hiperhídricos (PEH) e consistência de calejamento (CC)

(Tabela 5). A partir das contribuições relativas de cada característica, utilizou-se a metodologia de descarte de variáveis, a qual consiste em identificar as características menos importantes para a divergência e descartá-los, sem alterar a formação de grupos obtidos pelo método de Tocher. Descartando-se as características PER, PEH e CC não houve alteração na formação dos grupos.

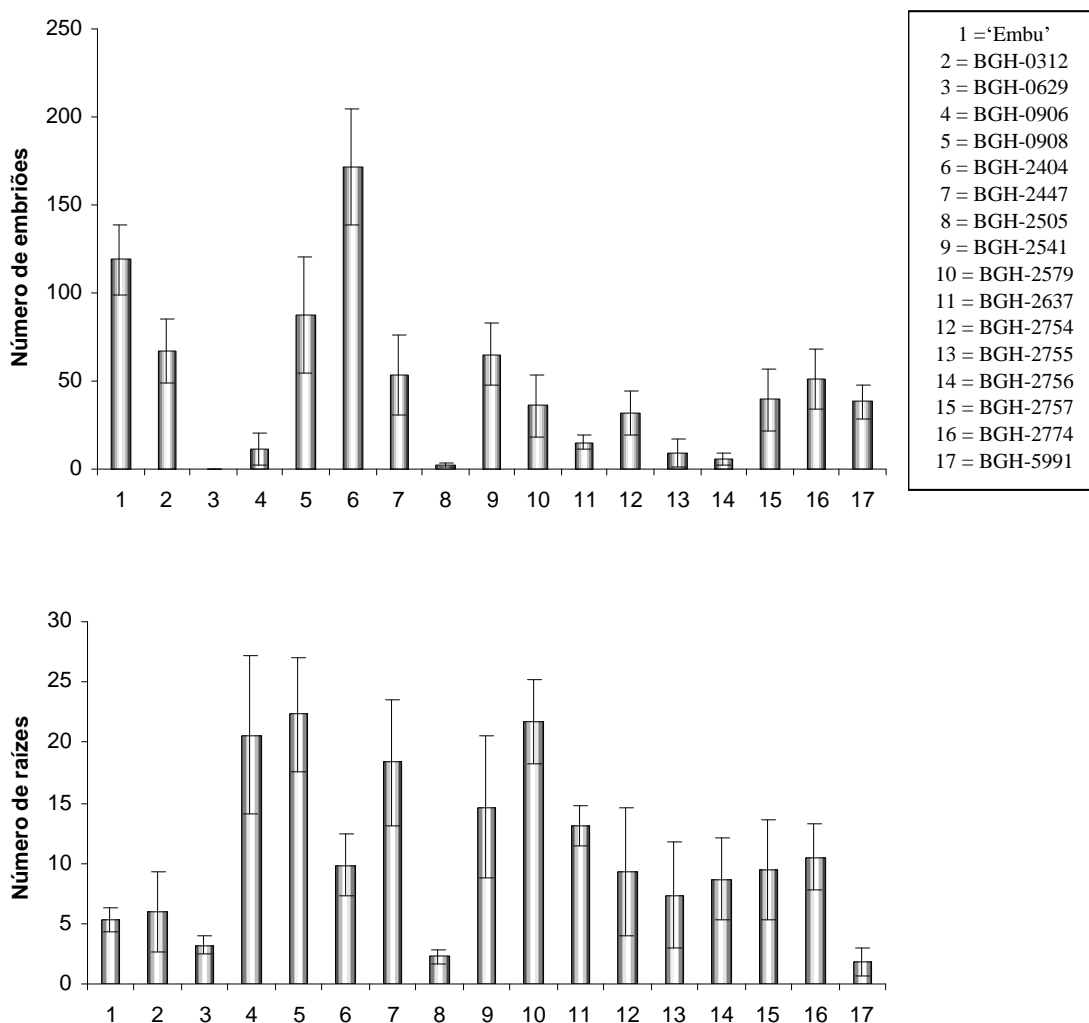


Figura 2. Resposta morfogênica dos diferentes acessos de berinjela do BGH-UFV, quando os explantes foram mantidos em meio MS suplementado com 10 mg L⁻¹ de ANA. As barras verticais indicam os erros padrões da média.

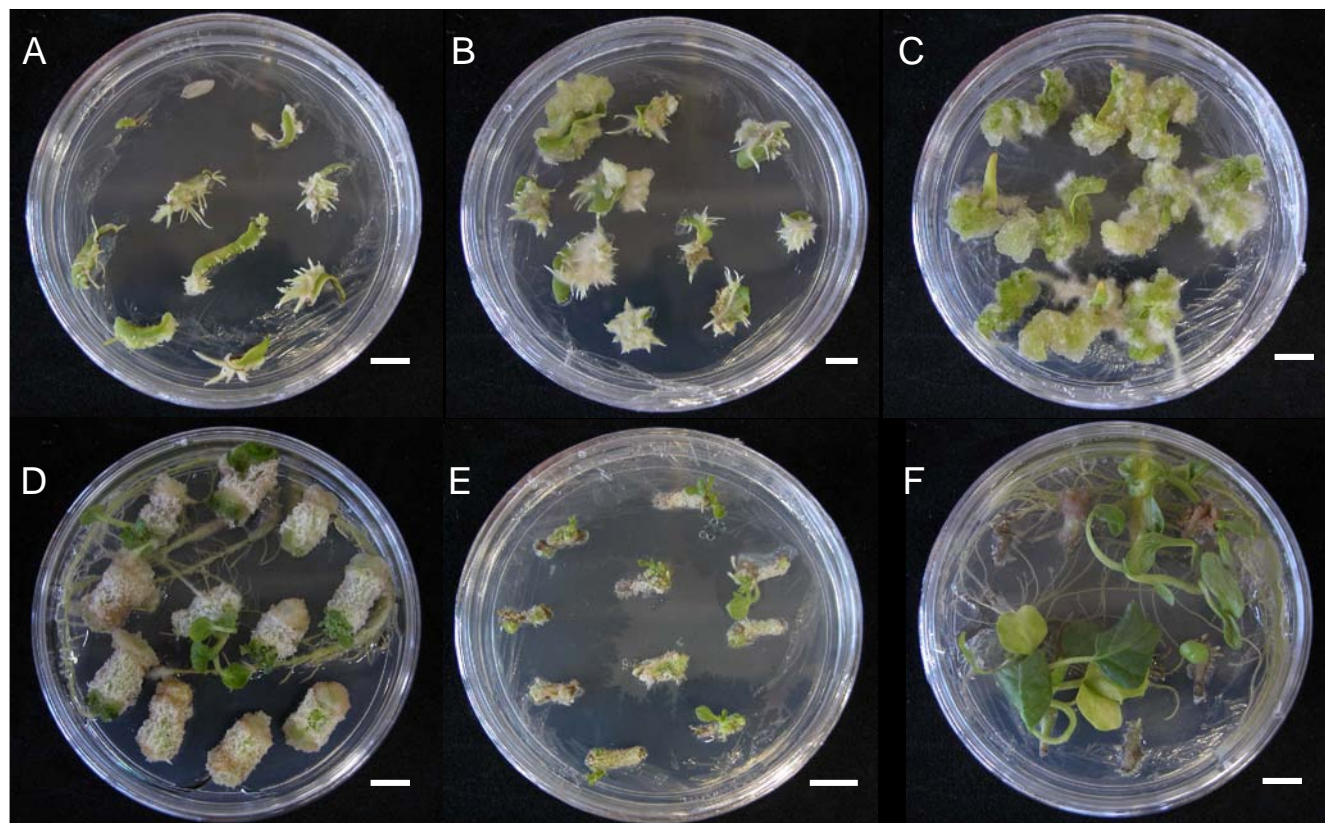


Figura 3. Respostas morfológicas de acessos de *Solanum melongena* L. do BGH-UFV à indução de organogênese e embriogênese somática. A, B e C = resposta morfológica observada em cotilédones quando cultivados em meio MS contendo 10 mg L⁻¹ de ANA. D, E e F = resposta morfológica observada em hipocótilos quando cultivados em meio MS contendo 0,1 mg L⁻¹ de AIA. A = BGH-2447; B = BGH-0909; C e D = BGH-2404; E = BGH-2579 e F = BGH-2541.

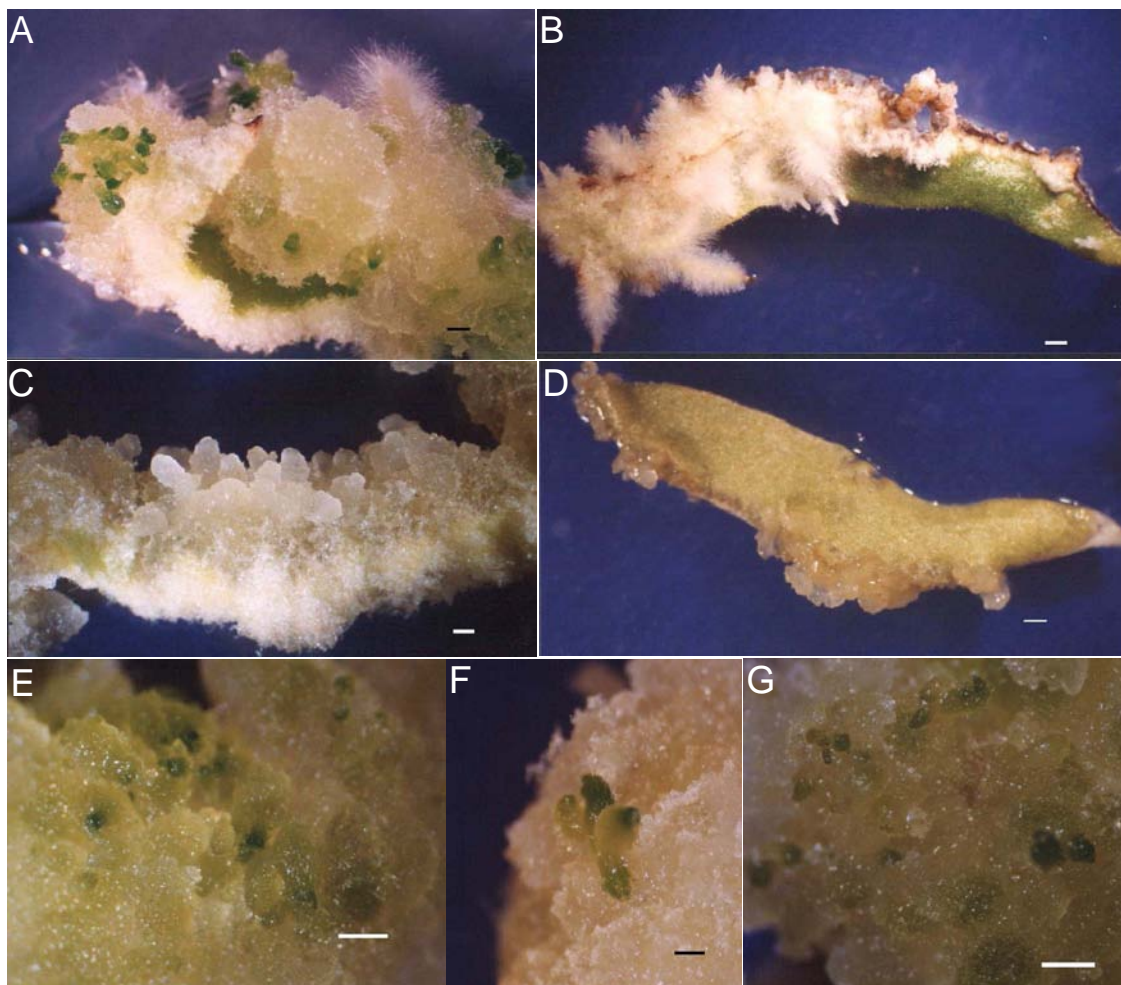


Figura 4. Respostas morfológicas de acessos de *Solanum melongena* L. do BGH-UFV à indução de embriogênese somática observada em cotilédones quando cultivados em meio MS contendo 10 mg L^{-1} de ANA. A = BGH-0908; B = BGH-0906; C = BGH-2505; D = BGH-5991; E = BGH-0312; F = BGH-0312 e G = BGH-2404. Barra = 1 mm.

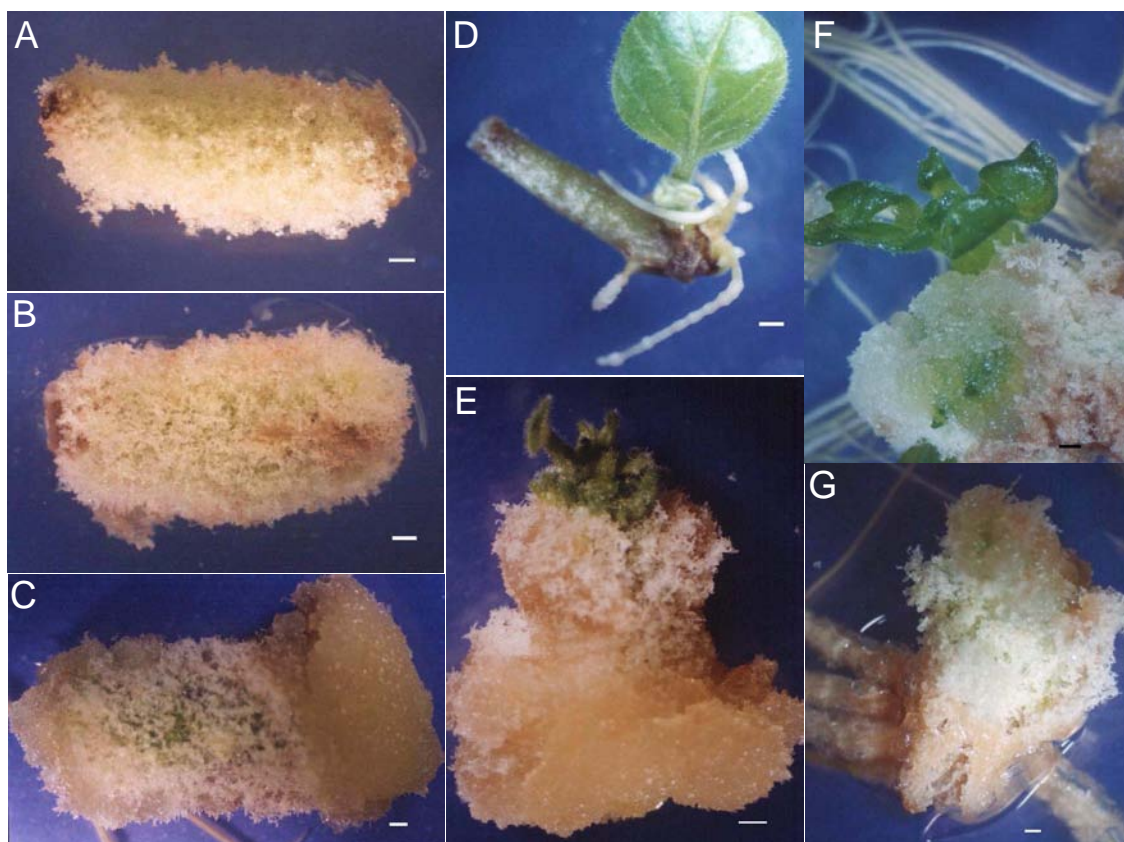


Figura 5. Respostas morfogênicas de acessos de *Solanum melongena* L. do BGH-UFV à indução de organogênese, observada em hipocótilos quando cultivados em meio MS contendo $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA. A = BGH-2541; B = BGH-2754; C = 'Embu'; D = BGH-0906; E = BGH-2637; F = BGH-2774; G = BGH-5991. Barra = 1mm.

Tabela 4. Agrupamento de acessos de berinjela (*Solanum melongena* L.), pelo método de otimização de Tocher, com base na distância Generalizada de Mahalanobis.

Grupos	Subgrupos	Acessos
I	I	BGH-0629 (3); BGH-2447 (7) e BGH-0906 (4)
	II	BGH-0908 (5); BGH-2505 (8); BGH-2756 (14); BGH-2774 (16) e BGH-2757 (15)
	III	BGH-2755 (13) e BGH-5991 (17)
	IV	BGH-2541 (9)
	V	BGH-2579 (10)
	VI	BGH-2754 (12)
II		'Embu' (1) e BGH-2404 (6)
III		BGH-0312 (2) e BGH-2637 (11)

Tabela 5. Contribuição relativa (S.j) dos caracteres para a divergência entre acessos de berinjela, utilizando-se a metodologia de SINGH (1981).

Referência	Característica	Contribuição
1	NRaiz	1.4530
2	NRam	0.8942
3	NG	0.7913
4	Peso O	1.5248
5	PER	0.000
6	PEH	0.000
7	IC	1.3838
8	CC	0.000
9	POA	2.0279
10	Peso E	0.7289
11	CorCb	3.6625
12	CorCa	5.4571
13	CorCv	2.3563
14	CorCm	10.6525
15	CorCaus	3.5811
16	ConsCf	1.3441
17	ConsCc	3.6291
18	ConsCfc	1.1476
19	ConsCAus	2.443
20	IntCb	3.2507
21	IntCm	11.4631
22	IntCa	15.5101
23	IntCaus	3.5811
24	NET	2.2317
25	LocE S	2.0043
26	LocE I	2.165
27	LocE SI	6.5511
28	LocE Aus	6.4188
29	NPR	1.0189
30	Nec	0.2435
31	Oxid	0.9676
32	Nbroto	1.5167

DISCUSSÃO

Uma etapa fundamental de um programa de melhoramento é a definição de germoplasma com variabilidade genética suficiente para incluir as características de interesse agrônomo (FERREIRA *et al.*, 1998). Para tal, o conhecimento sobre os níveis de variabilidade genética no germoplasma de uma espécie é de grande importância, pois permite acompanhar a manutenção desta variabilidade durante a multiplicação dos acessos e contribui com informações que podem melhorar a amostragem.

Dessa maneira, com base na resposta *in vitro*, a divergência genética de 16 acessos e da cultivar Embu foi estudada e encontrou-se diferença significativa nas diversas características. Observou-se no presente trabalho que a indução de organogênese depende do genótipo utilizado, resultado que está de acordo com os obtidos por SHARMA e RAJAM (1995), no qual o genótipo contribuiu com cerca de 57,4 %, enquanto o tipo de explante com 18,8 % e a interação genótipo-explante com 19,2 % para a variação no número de brotos adventícios de berinjela. O mesmo foi observado em *Helianthus annuus* L. (BERRIOS *et al.*, 1999; SARRAFI *et al.*, 1996), *Vitis* sp. (REISCH, 1986) e *Zea mays* (BECKERT e QING, 1984).

Além disso, grande variabilidade também foi observada nos explantes mantidos no meio de indução de embriogênese. Resultado semelhante foi descrito anteriormente para berinjela (GLEDDIE *et al.*, 1983; SAITO e NISHIMURA, 1994; SHARMA e RAJAM, 1995; FRANKLIN *et al.*, 2004), porém estes autores testaram um número menor de genótipos. Assim como uma variabilidade alta foi observada para outras espécies, dentre estas: *Medicago sativa* (NAGARAJAN *et al.*, 1986) e *Triticum aestivum* (SEARS e DECKARD, 1982).

A partir da identificação dos genótipos com maiores habilidades regenerativas, vários estudos podem ser realizados, tais como, identificar genótipos úteis para cruzamento e seleção de linhagens responsivas *in vitro*, como descrito

para alfafa (BINGHAM et al., 1975), *Lycopersicon* sp. (FARIA e ILLG, 1996). Pode-se, ainda, conduzir estudos moleculares e identificar, clonar e sequenciar genes de interesse. Alguns estudos já foram realizados e alguns genes de cenoura (BISHOP-HURLEY et al., 2003), de *Medicago triculata* (NOLAN et al., 2003), de *Arabidopsis thaliana* (MAGIOLI et al., 2001) e de *Solanum melongena* (BUCHERNA et al., 2001) foram isolados e clonados. Interessantemente, em berinjela 'Heynh. Ecotipo C24 foi verificado que a expressão do gene de *Arabidopsis thaliana*, *Atgrp-5*, estava associada à habilidade de resposta embriogênica de embriões zigóticos. (MAGIOLI et al., 2001).

Como um estudo inicial deste trabalho, foi realizada uma análise da divergência genética baseada em caracteres morfológicos. Segundo PIASI, (1994), estudos de divergência genética já eram realizados há mais de duas décadas com objetivos de: avaliar o grau de divergência entre grupos de genótipos (indivíduos, variedades, cultivares, linhagens, etc); avaliar o comportamento de genótipos em diferentes ambientes; avaliar a superioridade de alguns genótipos sobre outros, com base na combinação linear de características de importância econômica; identificar genótipos divergentes que possam ser utilizados como progenitores em programas de hibridação e relacionar a divergência genética com a heterose e, ou, diversidade de origem geográfica.

O processo de agrupamento envolve, basicamente, duas etapas; a primeira relaciona-se com a estimação de uma medida de similaridade (ou dissimilaridade) entre os progenitores e, a segunda, com a adoção de uma técnica de agrupamento para a formação dos grupos (CRUZ e REGAZZI, 1997).

Conclui-se que os pares de acessos mais e menos dissimilares coincidiram, além de se observar coerência entre a região de coleta e a divergência dos caracteres. O método de otimização de Tocher pode ser utilizado em estudos de variabilidade genética, quando utilizadas as características descritas neste trabalho como descritores de germoplasma de berinjela.

Além disso, a avaliação e caracterização de Bancos de Germoplasma para respostas *in vitro* demonstraram variabilidade nas características analisadas. Essa metodologia deve ser incorporada na busca de genótipos com melhores respostas,

devido, principalmente a crescente utilização da cultura de tecidos em etapas do melhoramento.

Como verificado, a influência do genótipo é proeminente na cultura de tecidos vegetais. Assim, a identificação de genótipos mais e menos responsivos, como protocolos de regeneração para materiais genéticos, é essencial para prosseguir com os experimentos. Essa escolha de genótipos contrastantes pode já fornecer materiais genéticos para uma etapa seguinte de cruzamentos e estudo das características. Essas duas etapas por si, já representam um avanço em termos de melhoramento, pois permitem a seleção de materiais mais responsivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECKERT, A., C.M. QING. 1984. Results of a diallel trial a breeding experiment for *in vitro* aptitude in maize. Theor. Appl. Genet. 68:247-251.

BERRIOS, E.F., L. GENTZBITTEL, H. SERIEYS, G. SALIBERT, A. SARRALI. 1999. Influence of genotype and gelling agents on *in vitro* regeneration by organogenesis in sunflower. Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 59:65-69.

BINGHAM, E.T., L.V. HURLEY, D.M. KAATZ, J.W. SAUNDERS. 1975. Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. Crop Sci. 15:719-720.

BISHOP-HURLEY, S.L., R.C. GARDNER, C. WALTER. 2003. Isolation and molecular characterization of genes expressed during somatic embryo development in *Pinus radiata*. Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 74:267-281.

BROWN, D.C.W. 1988. Germoplasm determination of *in vitro* somatic embryogenesis in alfalfa. HortScience 23:526-531.

BUCHERNA, N., E. SZABÓ, L.E. HESZKY, I. NAGY. 2001. DNA methylation and gene expression differences during alternative *in vitro* morphogenetic processes in eggplant (*Solanum melongena* L.). In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant 37:672-677.

COLLONIER, C., I. FOCK, V. KASHYAP, G.L. ROTINO, M.C. DAUNAY, Y. LIAN, I.K. MARISKA, M.V. RAJAM, A. SERVAES, G. DUCREUX, D. SIHACHAKR. 2001. Applications of biotechnology in eggplant. Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 65:91-107.

CRUZ, C.D., A.J. REGAZZI. 1997. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2 ed. Editora UFV, Viçosa, MG.

CRUZ, C.D. 2001. Programa GENES. Editora UFV. Release Versão Windows. Editora UFV, Viçosa.

FARIA, R.T., R.D. ILLG. 1996. Inheritance of *in vitro* plant regeneration ability in the tomato. Rev. Bras. Genet. 19:113-116.

- FERREIRA, M.E., L.S. CALDAS, E.A. PEREIRA. 1998. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas, *In* A.C. TORRES, et al., eds. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, Vol. 1. Serviço de Produção de Informação - SPI, Brasília, DF.
- FRANKLIN, G., C.J. SHEEBA, C. LAKSHMI SITA. 2004. Regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.) from root explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 40:188-191.
- GAMBORG, O.L., R.A. MILLER, K. OJIMA. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- GLEDDIE, S., W. KELLER, G. SETTERFIELD. 1983. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *Solanum melongena* (eggplant). *Can. J. Bot.* 61:656-666.
- KOORNNEEF, M., C. HANHART, L.A. MARTINELLI. 1987. A genetic analysis of cell culture traits in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 74:633-641.
- KOORNNEEF, M., C. HANHART, M. JONGSMA, I. TOMA, R. WEIDE, P. ZABEL, J. HILLE. 1986. Breeding of a tomato genotype readily accessible to genetic manipulation. *Plant Sci.* 45:201-208.
- KOORNNEEF, M., J. BADE, C. HANHART, K. HORSMAN, J. SCHEL, W. SOPPE, R. VERKERK, P. ZABEL. 1993. Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. *Plant J.* 3:131-141.
- MAGIOLI, C., R.M. BARRÔCO, C.A.B. ROCHA, L.D. SANTIAGO-FERNANDES, E. MANSUR, G. ENGLER, M. MARGIS-PINHEIRO, G. SACHETTO-MARTINS. 2001. Somatic embryo formation in *Arabidopsis* and eggplant is associated with expression of a glycine-rich protein gene (*Atgrp-5*). *Plant Sci.* 161:559-567.
- MANTELL, S.H., J.A. MATTHEWS, R.A. McKEE. 1994. Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP.
- MARBACH, P.A.S. 1998. Calogênese e embriogênese somática em berinjela (*Solanum melongena* L.). Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- MITTEN, D.H., S.J. SATO, T.A. SKOKUT. 1984. *In vitro* regenerative potential of alfalfa germoplasm sources. *Crop Sci.* 24:943-945.
- MURASHIGE, T., F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

- NAGARAJAN, P., J.S. MCKENZIE, and P.D. WALTON. 1986. Embryogenesis and plant regeneration of *Medicago* spp. in tissue culture. *Plant Cell Rep.* 5:77-80.
- NASS, L.L. 2001. Utilização de recursos genéticos no melhoramento, p. 29-55, *In* L. L. NASS, et al., eds. Recursos Genéticos & Melhoramento - Plantas. Fundação MT, Rondonópolis, MT.
- NOLAN, K.E., R.R. IRWANTO, R.J. ROSE. 2003. Auxin up-regulates MtSERK1 expression in both *Medicago trunculata* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiol.* 133:218-230.
- PIASI, M. 1994. Avaliação do desempenho de linhagens de postura mantidas na Universidade Federal de Viçosa, em competição com marcas comerciais. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- PICOLI, E.A.T. 2000. Morfogênese *in vitro* e transformação genética de berinjela (*Solanum melongena* L. cv. Embu) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- REISCH, B.I. 1986. Influence of genotype and cytokinins on *in vitro* shoot proliferation of grapes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111:138-141.
- SAITO, T., S. NISHIMURA. 1994. Improved culture conditions for somatic embryogenesis using an aseptic ventilative filter in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Sci.* 102:205-211.
- SARRAFI, A., A.R. BOLANDI, H. SERIEYS, A. BERVILLÉ, G. ALIBERT. 1996. Analysis of cotyledon culture to measure genetic variability for organogenesis parameters in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Sci.* 121:213-219.
- SEARS, R.G., E.L. DECKARD. 1982. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. *Crop Sci.* 22:546-550.
- SHARMA, P., M.V. RAJAM. 1995. Genotype, explant and position effects on organogenesis and somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). *J. Exp. Bot.* 46:135-141.
- SINGH, D. 1981. The relative importance of characters affecting divergence. *Ind. J. Genet. Plant Breed.* 41:237-245.
- SUNG, Z.R., J.M. SMITH, J.H. CHOI, M. KRAUSS, C. BORKIRD, L.S. LIU. 1988. Gene expression in embryogenesis. *HortScience* 23:513-515.

Capítulo II

Influência da concentração mineral do meio MS e de agentes gelificantes na morfogênese *in vitro* de berinjela (*Solanum melongena* L. ‘Embu’)

RESUMO

Este trabalho avaliou os efeitos da concentração de sais do meio MS e de agentes gelificantes na germinação *in vitro* de sementes de berinjela, na capacidade de absorção de nutrientes pelas plântulas e na condição fisiológica de explantes com relação as respostas à organogênese e, ou à embriogênese somática. Sementes de ‘Embu’ (Horticeres[®]) foram desinfestadas e inoculadas em meio composto de sais MS completo (força total) ou com a metade da concentração (metade da força), acrescido de vitaminas B₅, 100 mg L⁻¹ de inositol, 2% de sacarose, solidificado com 6,5 g L⁻¹ de Ágar Merck[®], 5,8 g L⁻¹ de AgargelTM ou 2,8 g L⁻¹ de PhytigelTM. Explantes cotiledonares ou hipocotiledonares provenientes de plântulas com 15 dias, foram inoculados em meio MS como descrito acima, solidificado com 6,5 g L⁻¹ de ÁgarTM, ao qual acrescentou-se 10 mg L⁻¹ de ANA (ácido α -naftaleno acético) ou 0,1 mg L⁻¹ de AIA (ácido indolacético) para indução de embriogênese somática ou organogênese, respectivamente. No meio de indução de embriogênese somática, detectou-se que o número de embriões somáticos formados em Agargel foi menor. No meio de indução de organogênese, observou-se significância apenas para a característica peso da matéria seca. Para avaliar a influência da concentração dos sais de MS, ápices caulinares foram inoculados em meio MS, solidificado com 6,5 g L⁻¹ de Ágar (Merck[®]), variando-se a concentração salina de meio MS (25, 50, 75 e 100%). Plântulas mais vigorosas foram obtidas em meio contendo 50% dos sais MS. Pela determinação dos teores dos elementos nos agentes gelificantes, observou-se uma grande variação nos elementos químicos, porém para a maioria dos elementos a concentração foi menor no Ágar e maior no Phytigel. O teste de pureza com AgNO₃ indicou que o Ágar foi o mais impuro, seguido pelo Agargel, e finalmente pelo Phytigel[®].

Palavras chave: agentes gelificantes, testes de pureza e de difusão; teor de elementos.

INTRODUÇÃO

Os tecidos e órgãos vegetais crescidos *in vitro* são inoculados em um meio que fornece os nutrientes necessários para o crescimento; logo, o sucesso da cultura de tecidos para propagação vegetal é influenciado pela natureza química do meio de cultivo utilizado (GEORGE, 1993).

A nutrição mineral *in vitro* envolve o movimento de íons para os tecidos em crescimento e dependente da sua disponibilidade no meio (WILLIAMS, 1993). Os nutrientes são absorvidos passivamente ou por mecanismos envolvendo gasto de energia. A absorção ativa é, em geral, menos dependente da concentração iônica do que a absorção passiva. Contudo, ambos sistemas são influenciados pelas concentrações de outros elementos, pH, temperatura e estado fisiológico e bioquímico dos tecidos vegetais (GEORGE, 1993).

A disponibilidade de minerais no meio é parte essencial do sistema de cultura de tecidos. Atualmente, os meios utilizados são baseados em derivações com modificações de poucas formulações básicas, dentre estas pode-se citar MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e WHITE (1954). O que se observa é uma variedade de sistemas de cultivos, cada qual com concentrações nutricionais consideradas ótimas e exclusivas, adequadas a cada genótipo (WILLIAMS, 1993).

Os nutrientes minerais são responsáveis por funções específicas no metabolismo, sendo que a deficiência ou o excesso pode comprometer a morfogênese. Assim, a variação nos componentes do meio (especialmente nas fontes de nitrogênio) tem marcante influência sobre as respostas morfogênicas, sendo fundamental a condução de avaliações nutricionais, assim como, dos requerimentos hormonais (GLEDDIE *et al.*, 1983).

Além disso, a taxa de absorção pela planta pode ser limitada pela taxa de difusão pelo gel e pelo “status” da água no meio. Essas características são afetadas pela concentração e pelo tipo de agentes gelificantes, que podem afetar também o

potencial mátrico e a disponibilidade da água da planta para a transpiração (WILLIAMS, 1993).

A escolha do agente gelificante é muito importante para a regeneração *in vitro*. O meio deve estar consistente o suficiente para dar suporte ao explante, porém se estiver rígido demais pode dificultar o contato e a translocação de nutrientes do meio para os tecidos (GEORGE, 1993; BERUTO *et al.*, 1999). O estado físico do meio pode afetar a difusão dos reguladores de crescimento e nutrientes (BORNMAN e VOLGELMANN, 1984; BERUTO *et al.*, 1999), modificando a disponibilidade de substâncias solúveis por meio de interações químicas (BERRIOS *et al.*, 1999).

Os agentes gelificantes mais utilizados na cultura de tecidos são o Ágar, Agargel e Phytigel. O Ágar é um produto natural extraído de algas vermelhas, principalmente *Gelidium amansii* composto por uma mistura complexa de polissacarídeos principalmente agarose e agarpectinas. O Phytigel e o Gelrite são hetero- polissacarídeos produzidos da bactéria *Pseudomonas elodea*, e são compreendidos de moléculas de keto-glucuronato, ramnose e celobiose. O Agargel, por sua vez, é composto pela mistura de Ágar e Phytigel (GEORGE, 1993).

A influência do tipo de agente gelificante ou da concentração utilizada na cultura de tecidos foi descrita para várias espécies como *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (REIS, 2001; REIS *et al.*, 2005), *Linum usitatissimum* (LAINE *et al.*, 2000), *Syzygium alternifolium* (SHA VALLI KHAN *et al.*, 1999), *Picea mariana* e *P. rubens* (TREMBLAY e TREMBLAY, 1991), *Helianthus annuus* (BERRIOS *et al.*, 1999), *Pinus strobus* (KLIMASZEWSKA *et al.*, 2000) e *Rosa hybrida*, *Lilium* 'Enchantment' e *Sulcorebutia alba* (SCHOLTEN e PIERIK, 1998a).

A opção por concentrações inadequadas de agentes gelificantes pode influenciar negativamente nas taxas de propagação (BERRIOS *et al.*, 1999). A maioria das espécies vegetais exibe algum tipo de sensibilidade à qualidade do agente gelificante e esta é dependente do tipo e da marca comercial (SCHOLTEM e PIERIK, 1998a). Várias marcas e tipos estão disponíveis no mercado e estas diferem na quantidade de impurezas contida e na sua capacidade de solidificar.

Estas características podem alterar as propriedades químicas e físicas do meio (GEORGE, 1993).

Além disso, as concentrações variáveis de sais presentes na forma de impurezas nos diferentes tipos de agente gelificante podem ter influência marcante na habilidade de regeneração (BERUTO *et al.*, 1999; SCHOLTEN e PIERIK, 1998b; NGUYEN *et al.*, 1999).

Um exemplo é o trabalho de KLIMASZEWSKA *et al.* (2000), que observaram que a resposta de maturação de *Pinus strobus* nos tecidos embriogênicos foi promovida pelo meio de cultivo com altas concentrações de todos os agentes gelificantes testados.

O desenvolvimento eficaz do sistema radicular em espécies lenhosas é normalmente inibido pelas condições anaeróbicas desfavoráveis do meio solidificado com Ágar. Os resultados superiores obtidos no meio com vermiculita como suporte foi devido a estrutura aerada (ao contrário do meio contendo Ágar), que permitiu o sistema radicular desenvolver com menores restrições gasosas (NAVATEL e BOURRAIN, 1994).

Uma baixa capacidade de absorção de água decorrente de um sistema radicular pobre foi observada em plântulas obtidas a partir de cortes nodais de *Eucalyptus camaldulensis* inoculados em Ágar, e este fator tem sido descrito como parcialmente responsável por severa perda de água das folhas durante a aclimação (ZOBAYED *et al.*, 2001).

Desta maneira, o objetivou-se avaliar os efeitos da concentração de sais do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e de agentes gelificantes, na germinação *in vitro* de sementes de berinjela (*Solanum melongena* L.), assim como determinar a capacidade de absorção dos nutrientes e estimar a influência do vigor dos explantes obtidos das plântulas na organogênese e embriogênese somática.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do material vegetal, concentração de sais MS e de agentes gelificantes na germinação *in vitro*

As sementes de berinjela (*Solanum melongena* L.) ‘Embu’ Horticides[®] utilizadas nos experimentos foram obtidas no comércio local de Viçosa, MG. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II, no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

As sementes foram embebidas por 72 horas em água deionizada e estéril, submetidas a desinfestação a cada 24 horas, ao longo deste período. Neste processo, foram imersas em álcool 70% por 1 minuto, seguido por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio (Brilhante[®]) a 2,5 % acrescido de 2 gotas de Tween 20 para cada 100 mL de solução e enxaguadas por três vezes consecutivas em água deionizada e estéril (PICOLI, 2000).

Posteriormente, as sementes foram inoculadas em meio composto de sais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) completo (força total) ou com a metade da concentração (metade da força), acrescido de vitaminas B₅ (GAMBORG *et al.*, 1968), 100 mg L⁻¹ de inositol e 2% de sacarose, solidificado com 6,5 g L⁻¹ de Ágar Merck[®] (*Agar-agar purified and free for microbiology* – Merck KgaA, Germany), 5,8 g L⁻¹ de Agargel[™] (*Sigma Chemical Company*, USA) ou 2,8 g L⁻¹ de Phytigel[™] (*Sigma Chemical Company*, USA), com o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C e a 1 atm, durante 20 minutos. Foram distribuídos 40 mL de meio de cultivo em cada frasco de vidro (12 cm de altura e 6 cm de largura) e cerca de 10 sementes foram inoculadas por recipiente.

As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e irradiância de $37 \pm 4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil). A avaliação foi realizada 15 dias após a germinação, contemplando os seguintes parâmetros: percentagem de germinação, número de plântulas, altura e diâmetro do hipocótilo, e comprimento e diâmetro do cotilédone. Foram conduzidos três experimentos independentes.

2.2. Explantes, concentração de sais MS e de agentes gelificantes na embriogênese somática e organogênese

Oito a dez cotilédones ou hipocótilos provenientes de plântulas com aproximadamente 15 dias, obtidas como descrito no item 2.1 foram utilizados como fonte de explantes para embriogênese somática ou organogênese, respectivamente. Os cotilédones foram seccionados longitudinalmente e inoculados em meio de cultivo com a face abaxial em contato com o meio. Segmentos de hipocótilo (~ 1 cm de comprimento) foram inoculados em meio de cultivo seguindo a orientação base-ápice.

O meio de cultivo constou de sais MS, acrescido de vitaminas B₅, 100 mg L⁻¹ de inositol, 2% de sacarose, 6,5 g L⁻¹ de Ágar (Merck®). Acrescentou-se como regulador de crescimento 10 mg L⁻¹ de ANA (ácido α -naftaleno acético) ou 0,1 mg L⁻¹ de AIA (ácido indolacético) nos meios para indução de embriogênese ou organogênese, respectivamente. Sendo que, o ANA foi adicionado antes da autoclavagem e o AIA, após. O pH foi ajustado para 5,8 e o meio vertido em placas de Petri estéreis de 9 cm de diâmetro e 1,2 cm de altura. As placas foram mantidas sob as condições de cultivo citadas no item 2.1.

Na indução de embriogênese somática, após 30 dias de cultivo, foram avaliados: o peso da matéria fresca; a consistência, a cor e a intensidade do calejamento; o número total de embriões; o número de primórdios radiculares; e a ocorrência de necrose ou e hiperhidricidade. Para a organogênese, foram observados aos 30 dias: o peso da matéria fresca; a coloração, a intensidade e a

consistência do calejamento; o número de ramos, de gemas e de raízes; e a ocorrência de hiperhidricidade.

2.3. Concentração de sais MS no alongamento dos ápices caulinares

As sementes foram desinfestadas como descrito no item 2.1. Em seguida, foram inoculadas em meio composto de sais MS, com a metade da concentração (metade da força), acrescido de vitaminas B₅ (GAMBORG *et al.*, 1968), 100 mg L⁻¹ de inositol, 2% de sacarose e solidificado com 2,8 g L⁻¹ de Phytigel[®] (Sigma). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C e a 1 atm, durante 20 minutos. As culturas foram mantidas sob as condições descritas no item 2.1.

Os ápices caulinares (~10-15mm), provenientes de plântulas com aproximadamente 15 dias foram inoculados em meio de cultivo composto de sais MS, vitaminas B₅, 100 mg L⁻¹ de inositol, 2% de sacarose, 6,5 g L⁻¹ de Ágar[®] (Merck). A concentração de meio MS variou entre os tratamentos (25, 50, 75 e 100%).

2.4. Teste de impureza e difusão de sais dos agentes gelificantes

O teor de impurezas de cada agente gelificante em relação ao teor de cloro foi avaliado pelos testes com AgNO₃ e de difusão utilizando-se AgNO₃ e KI, ambos descritos por SCHOLTEN e PIERIK (1998b).

2.5. Teores dos macro e micronutrientes nas plântulas e nos diferentes agentes gelificantes

As plântulas crescidas em meio MS metade da força e força completa solidificado com Ágar, Agargel ou Phytigel foram seccionadas na base. Posteriormente, as partes áreas destas plântulas foram mantidas em estufa a 60°C

por cerca de 48 h. Após as plântulas estarem completamente secas estas foram maceradas no cadinho com auxílio de pistilo, cerca de 1 g foi utilizado para a determinação do teor de macro e micronutrientes.

Para estar o teor de impureza em relação a concentração dos demais compostos, os agentes gelificantes, Ágar, Agargel e Phytigel também foram utilizados na análise mineral. Para a análise, foram utilizados cinco frascos de cada tratamento, sendo que cada um continha dez plântulas.

As análises foram realizadas pelo Laboratório de Análise Foliar do Departamento de Solos, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

2.6. Delineamento experimental

Todos os experimentos foram repetidos e seguiram o delineamento inteiramente casualizados (DIC). Os dados foram submetidos á análise de variância (ANOVA) e, para a comparação entre as médias dos tratamentos foi realizado o teste de Tukey a 5% de significância para todos os experimentos. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa GENES versão Windows/2004.2.1, desenvolvido por CRUZ (2001).

RESULTADOS

3.1. Influência da concentração de sais MS e de agentes gelificantes na morfogênese *in vitro*

As plântulas crescidas em meio MS meia força ou força completa, solidificado com Ágar, Agargel ou Phytigel, foram avaliadas e observou-se o desenvolvimento de epicótilo e de folhas nas plântulas crescidas em meio MS força completa, o que não ocorreu no meio contendo metade da concentração de sais (Figura 1).

Não se observou diferença significativa nos diversos tratamentos quando analisada a característica germinação das sementes, pelo teste de médias (Figura 2). Entretanto, observou-se que as médias do número de plântulas (NP) e o comprimento do cotilédone (CCot) obtidas em Phytigel, tanto na metade quanto força completa de MS, foram maiores que os demais tratamentos. Todavia, para as mesmas características, os menores valores e valores intermediários foram obtidos para plântulas desenvolvidas em Ágar e em Agargel, respectivamente. Quando se compara os resultados para cada agente gelificante, observa-se tendência das plântulas mantidas em força total apresentarem valores maiores comparativamente às crescidas em metade da força do meio MS (Figura 2).



Figura 1. Efeito dos agentes gelificantes na germinação de sementes de berinjela (*Solanum melongena* L. 'Embu'). A: Plântulas com 20 dias desenvolvidas em Ágar (I), Agargel (II) e Phytigel (III) em meio MS metade da força. B: Plântulas desenvolvidas em Ágar (I), Agargel (II) e Phytigel (III) em meio MS força completa. Barra – 1 cm.

As plântulas provenientes dos diferentes tratamentos foram utilizadas como fontes de explantes para a indução de embriogênese somática (cotilédones) e de organogênese (hipocótilos). Para as características qualitativas, observou-se que não houve diferença entre os tratamentos, sendo que a intensidade de calejamento foi mediana e a maioria dos calos friáveis; nesses, os embriões diferenciavam-se tanto no interior quanto na superfície do calo e pouca oxidação e necrose foram observadas (dados não apresentados).

Os explantes obtidos de plântulas crescidas em meio MS, em sua metade da força, solidificado com Phytigel, apresentaram o peso da matéria fresca (PMF) estatisticamente inferior ao tratamento MS força completa. Além disso, o número de embriões (NE) obtido no meio MS força completa solidificado com Agargel foi inferior estatisticamente do tratamento MS meia força. Não foram observadas diferenças nas respostas rizogênicas (Figura 3).

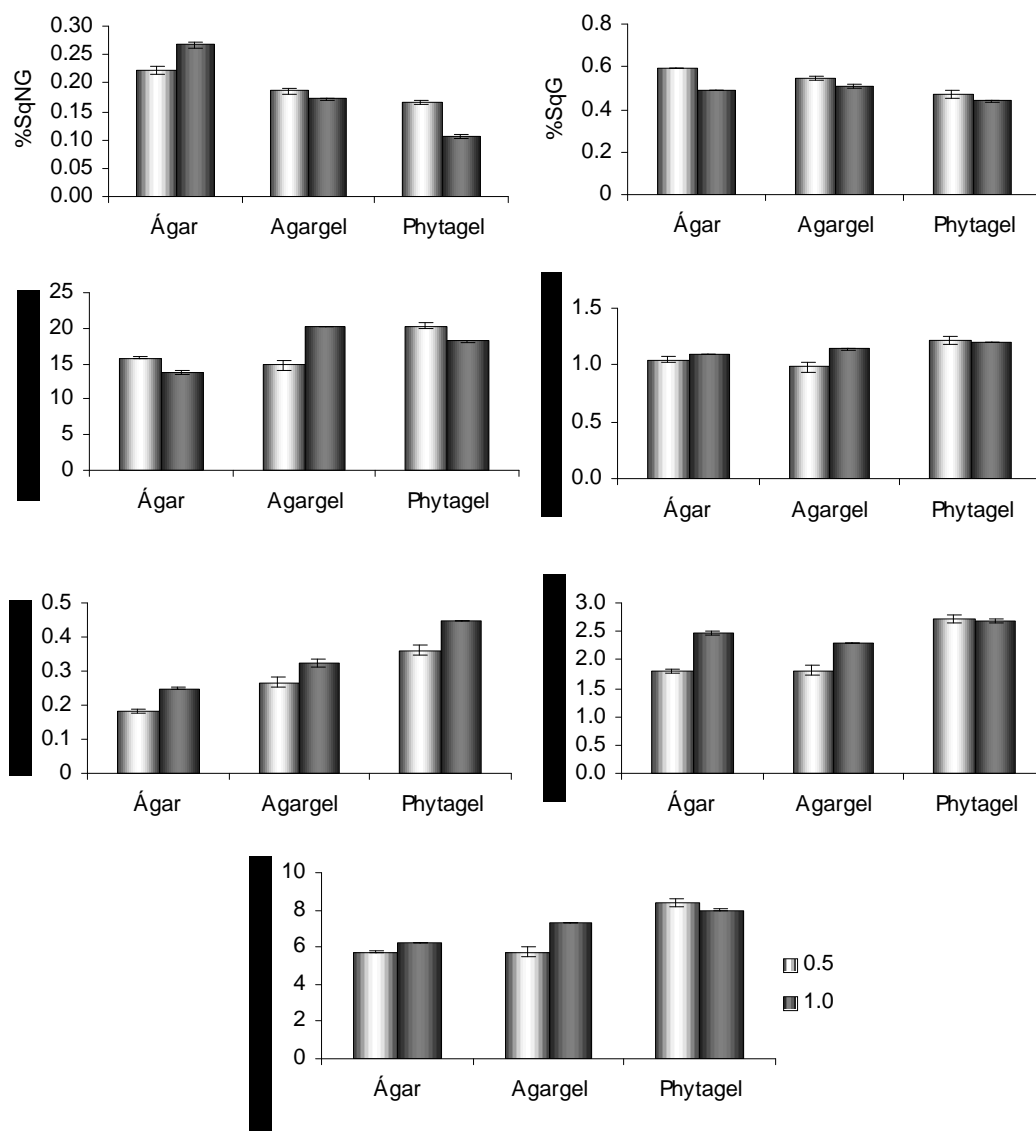


Figura 2. Efeito dos agentes gelificantes e concentração de sais MS na germinação de sementes de berinjela (*Solanum melongena* L. 'Embu'). Médias provenientes de 3 experimentos conduzidos independentemente. As barras verticais indicam os erros padrões da média.

%SqNG – percentagem de sementes não germinadas;

%SqG – percentagem de sementes germinadas;

0,5 – meio MS metade da força (MS ½);

1,0 – meio MS força total.

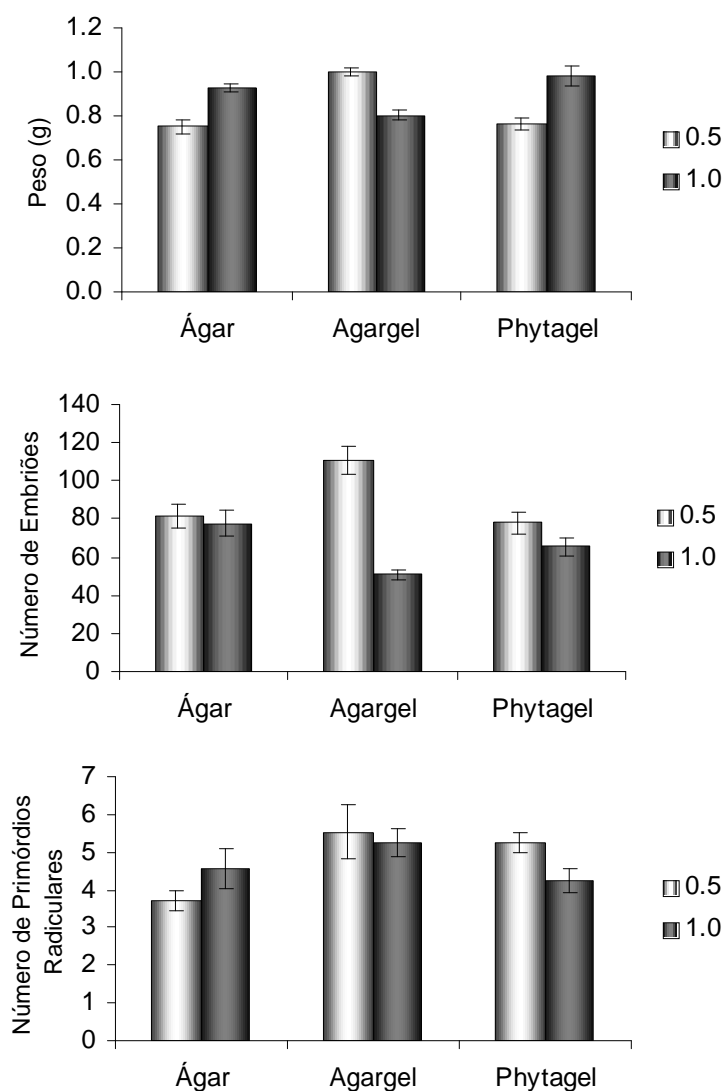


Figura 3. Efeito dos agentes gelificantes e da concentração de sais MS na obtenção de plântulas utilizadas como fonte de explantes na indução de embriogênese somática *in vitro* em *Solanum melongena* L. 'Embu'. As barras verticais indicam os erros padrões da média.

0,5 – meio MS metade da força (MS ½);

1,0 – meio MS força total (MS).

Independente da concentração do meio, observa-se que os explantes obtidos de plântulas crescidas em Ágar apresentaram baixa formação de calo, de ramos, de gemas e de raízes. Nos demais tratamentos, solidificados com Agargel ou Phytigel, visualiza-se alto calejamento e formação de ramos e de raízes (Figura 4).

Os explantes retirados de plântulas crescidas em MS metade da força, solidificado com Phytigel, apresentaram maior número de regenerantes hiperhídricos apesar de, em geral, ter sido baixo o número em todos os tratamentos (Figura 4).

Observou-se no meio MS metade da força e solidificado com Agargel, ramos menores e amarelados. Já em relação à formação de raízes, foi baixa nos explantes provenientes de plântulas crescidas em MS força completa solidificado com Phytigel (Figura 4).

Observou-se diferença visual nos tratamentos (Figura 5), porém estas não foram confirmadas estatisticamente. A exemplo, intensidades de calejamento baixa, mediana e alta foram observadas em todos os tratamentos e distribuídas de maneira semelhante entre esses. Em todos os tratamentos a consistência dos calos foi cerca de 60% friável e o restante compacto. Além disso, baixa frequência de oxidação e de hiperhidricidade nos explantes foi observada em todos os tratamentos.

Ápices caulinares foram cultivados em meio MS contendo 25%, 50%, 75% ou 100% dos sais MS. Durante a avaliação das plântulas obtidas a partir desses ápices caulinares, realizada aos 30 dias, observou-se plântulas maiores e mais vigorosas no meio contendo 50% dos sais MS. Naquelas desenvolvidas em meio com 75% da concentração de sais MS, pôde-se observar calejamento na base, epinastia e senescência, sendo que estas características apresentaram-se mais acentuadas em plantas crescidas em meio contendo 100% de sais MS (Figura 6).

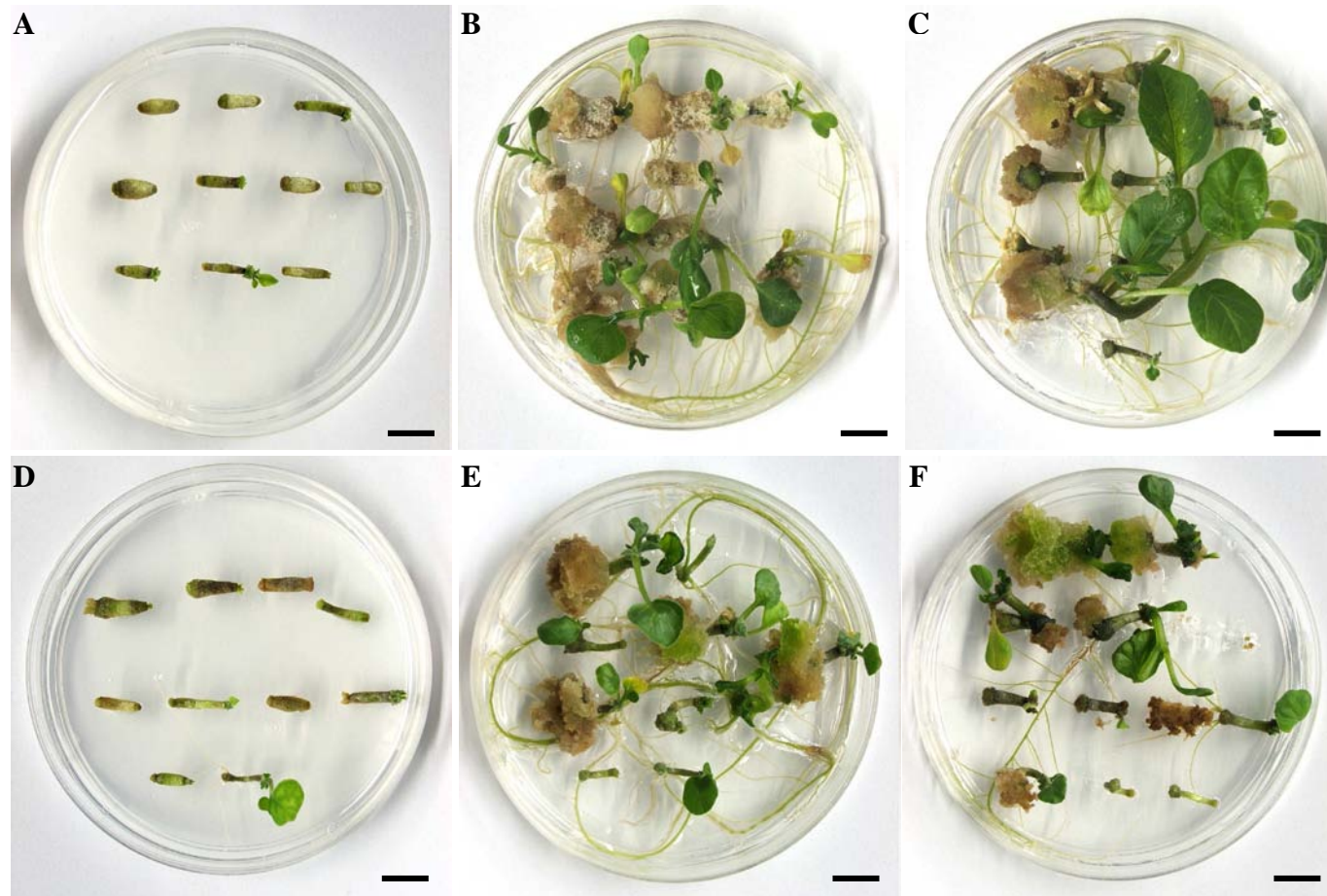


Figura 4. Respostas morfológicas em segmentos de hipocótilos de *Solanum melongena* L. ‘Embu’. A, B e C: meio MS ½ força. D, E e F: meio MS força completa. A e D: meio MS solidificado com Ágar. B e E: meio MS solidificado com Agargel. C e F: meio MS solidificado com Phytigel. Barra = 1 cm.

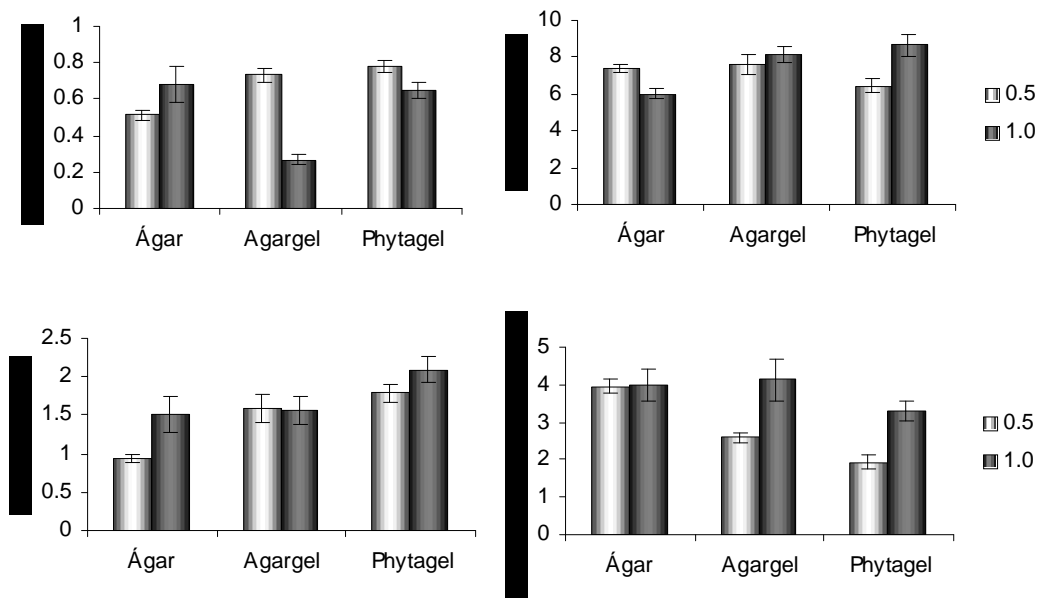


Figura 5. Efeito dos agentes gelificantes e da concentração de sais MS na obtenção de plântulas de *Solanum melongena* L. 'Embu' utilizadas como fonte de explantes na indução de organogênese *in vitro*. As barras verticais indicam os erros padrões da média.
 0,5 – meio MS metade da força (MS ½);
 1,0 – meio MS força total (MS).

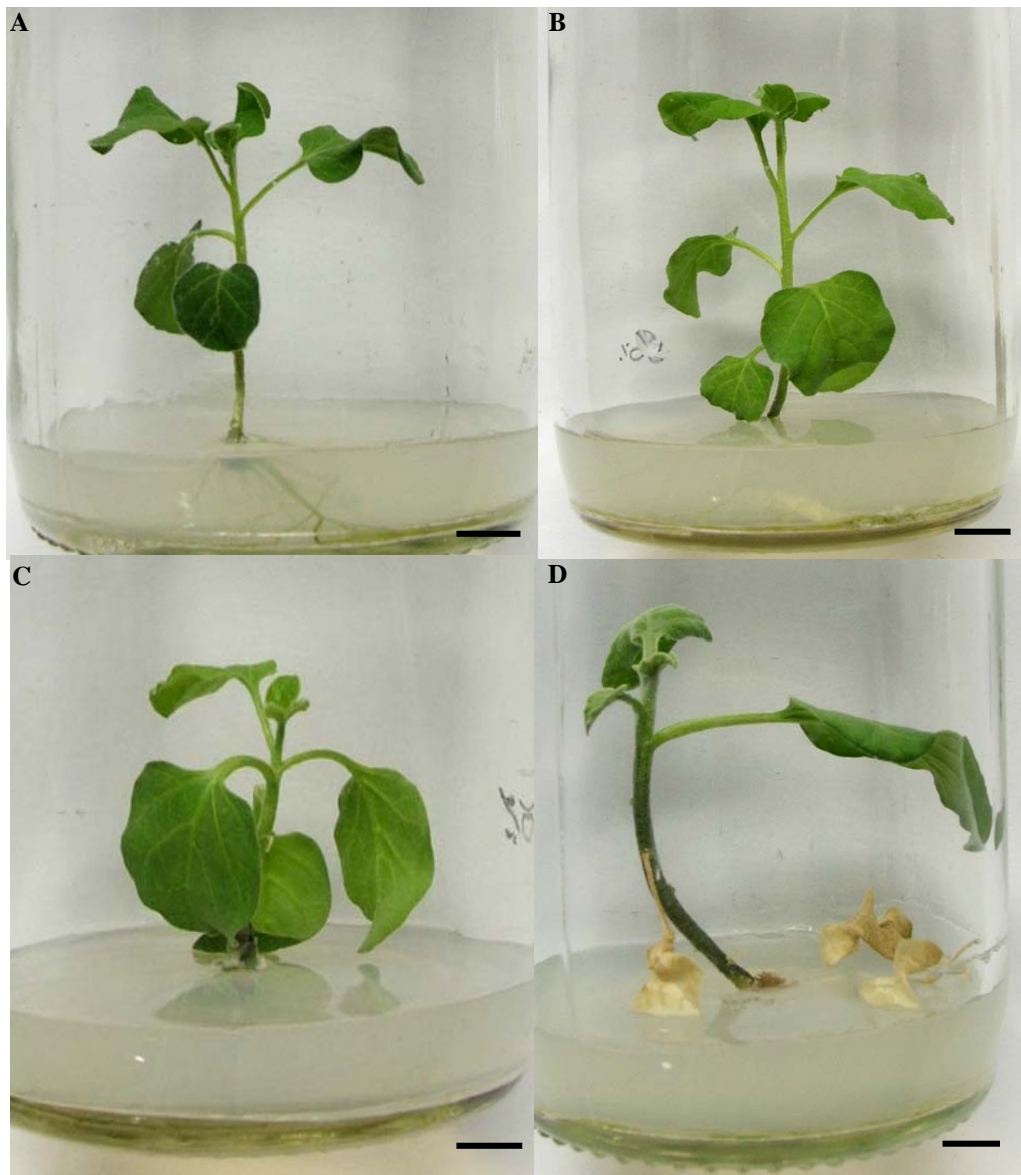


Figura 6. Desenvolvimento de ápices caulinares de *Solanum melongena* L. 'Embu' mantidos por 30 dias em meio solidificado com Ágar, contendo várias concentrações de sais MS. A – 25%; B – 50%; C – 75%; e D – 100% de sais MS. Barra = 1 cm.

3.2. Influência dos teores de macro e micro-elementos encontrados nas plântulas e agentes gelificantes

Foram quantificados os teores de macro e micronutrientes, a partir da análise da parte aérea das plântulas com 45 dias crescidas em meio MS metade da força e força completa solidificado com Ágar, Agargel ou Phytigel. Os dados obtidos, quando comparados aos de uma tabela-referência, indicaram deficiências de potássio, cálcio, magnésio e cobre em todos os tratamentos (Tabelas 4 e 5). O mesmo ocorreu com o fósforo e o nitrogênio nas plântulas mantidas em meio MS metade da força, solidificado com Phytigel. O único teor considerado alto foi o de manganês, em MS força completa solidificado com Ágar. O restante dos tratamentos apresentou teores considerados adequados. Todavia, não foi possível comparar o enxofre uma vez que a tabela utilizada como referência (JONES JR. *et al.*, 1991) não descreve a concentração desse composto para berinjela (Tabela 5).

Ao se comparar a concentração dos elementos químicos nas plantas, observou-se que no meio solidificado com Phytigel, as plântulas crescidas em MS meia força apresentaram metade da concentração para a maioria dos elementos. Porém, para Agargel e Ágar, em geral, os teores dos nutrientes apesar de terem apresentado valores próximos, os menores teores estavam no meio contendo a metade da força (Tabela 4).

Tabela 4. Teores de macro e micronutrientes observados em plântulas com 45 dias de *Solanum melongena* L. ‘Embu’ germinadas em meio MS metade da força e força completa e solidificados com Ágar (Merck), Agargel (Sigma) e Phytigel® (Sigma).

	Phytigel		Agargel		Ágar	
	[½]	[1]	[½]	[1]	[½]	[1]
N	2,736	4,189	3,122	5,432	3,524	3,586
P	0,213	0,458	0,433	0,516	0,421	0,445
K	1,974	2,620	2,289	1,949	2,022	2,075
Ca	0,219	0,304	0,340	0,445	0,327	0,433
Mg	0,095	0,129	0,124	0,160	0,118	0,188
S	0,094	0,146	0,172	0,183	0,146	0,177
Zn	29,8	40,4	41,4	66,0	42,2	78,8
Fe	81,6	64,0	60,8	56,0	52,8	67,5
Mn	57,1	109,4	105,6	171,4	121,4	258,6
Cu	2,0	1,7	2,8	2,7	1,7	2,7
B	25,1	39,5	35,3	40,9	35,3	46,9

Tabela 5. Classificação dos teores de macro e micronutrientes observados em 12 folhas totalmente expandidas de *Solanum melongena* L.

Elemento	Baixa	Adequado	Alto
	%		
N	3,50-3,99	4,0-6,0	>6,0
P	0,25-0,29	0,3-1,2	>1,2
K	3,00-3,49	3,5-5,0	>5,0
Ca	0,80-0,99	1,0-2,5	>2,5
Mg	0,25-0,29	0,3-1,0	>1,0
	ppm		
B	20-24	25-75	>75
<i>Cu</i>	5-7	8-60	>60
Fe	40-49	50-300	>300
Mn	35-39	40-250	>250
Zn	18-19	20-250	>250

Segundo JONES JR. *et al.* (1991).

Para verificar possíveis influências de impurezas presentes nos agentes gelificantes, foi utilizado o teste de pureza dos agentes gelificantes com solução de AgNO_3 . Esta solução foi aplicada diretamente sobre os géis formados com os diferentes agentes gelificantes (Figura 7). Notou-se a formação de um halo na região da gota e que com uma a duas horas este foi tornando-se escurecido, devido ao desenvolvimento de um precipitado de AgCl . A intensidade da coloração e o diâmetro do halo informam os teores de impurezas do agente gelificante. Pode-se observar que o halo formado no Ágar foi o mais escuro, seguido daquele produzido no Agargel; o halo formado no Phytigel foi quase imperceptível (Figura 7).

Adicionalmente, procedeu-se à análise química para determinação dos teores dos elementos nos agentes gelificantes (Tabela 6). Foi observado que para o zinco, os valores encontrados foram menores no Phytigel, intermediário no Agargel e maiores no Ágar. Ao contrário, os níveis mais elevados de nitrogênio, o potássio, o cálcio, o magnésio e o manganês foram detectados no Phytigel, intermediários no Agargel, e menores no Ágar. Para o cobre, as concentrações não diferiram entre os agentes gelificantes. Para o fósforo observou-se sua maior concentração no Ágar, seguida pelo Phytigel e Agargel. Para enxofre, ferro e boro detectaram-se as maiores concentrações em Agargel, intermediárias em Ágar e menores em Phytigel (Tabela 6).

A partir do teste de difusão, não se pode comparar os agentes gelificantes, uma vez que a presença de altas concentrações de cloro desencadeia uma reação química que resulta na formação de um precipitado de AgCl . Todavia, procedida à lavagem do Ágar e Agargel por três vezes, observou-se redução nos níveis de cloro em ambos agentes gelificantes (Figura 7; compare B e D, e C e E), mediante a visualização de discreta difusão no Ágar (Figura 8D). Porém, o mesmo não ocorreu no Agargel, sendo que o teor de cloro, mesmo após as lavagens, ainda impediu a difusão do AgNO_3 no meio (Figura 8E).

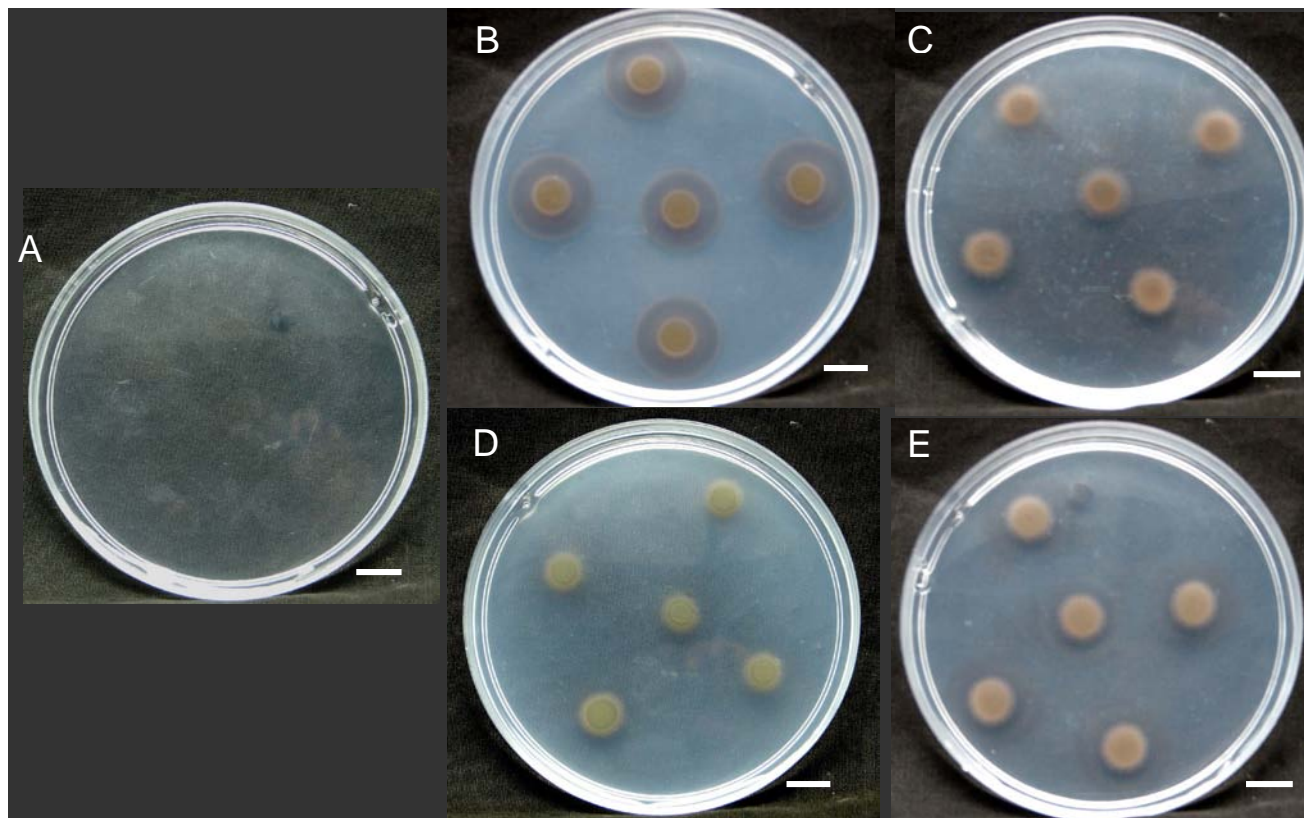


Figura 7. Determinação do teor de impureza dos agentes gelificantes a partir da formação de um precipitado marrom de AgCl após incubação dos géis com AgNO_3 . As placas representam A= Phytigel; B = Ágar; C = Agargel; D = Ágar lavado; E = Agargel lavado. Barra = 1 cm.

Tabela 6. Teores de impurezas (macro e micronutrientes) observadas nos diferentes agentes gelificantes, Ágar, Agargel e Phytigel.

	Ágar	Agargel	Phytigel
N	0,139	0,201	0,263
P	0,135	0,021	0,037
K	0,015	0,588	1,982
Ca	0,012	0,153	0,216
Mg	0,001	0,059	0,095
S	0,306	0,555	0,017
Zn	14,900	4,800	0,900
Fe	18,900	37,700	12,400
Mn	0,000	2,700	3,200
Cu	0,000	0,000	0,000
B	27,500	93,300	6,400

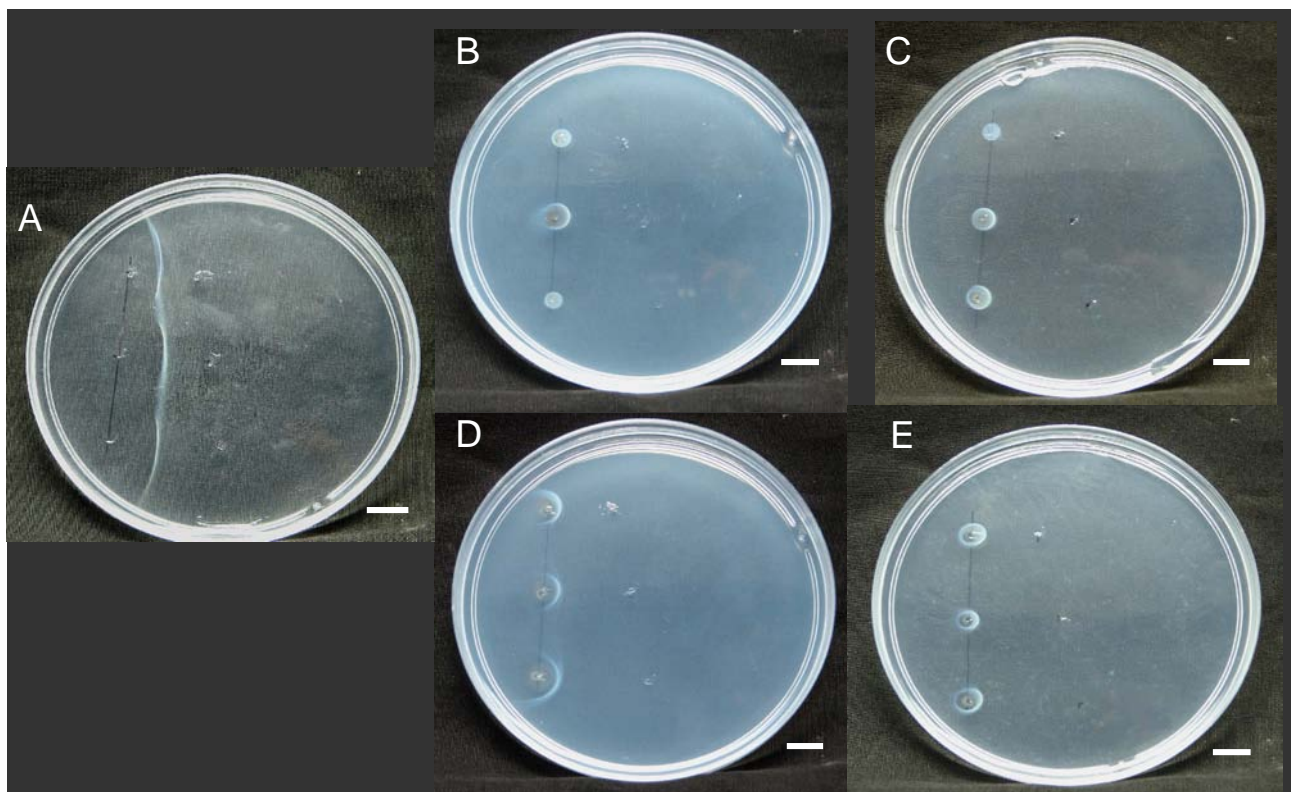


Figura 8. Teste de difusão no agente gelificante de AgNO_3 e KI, descrito por SCHOLTEN e PIERIK (1998a). A= Phytigel; B = Ágar; C = Agargel; D = Ágar lavado; E = Agargel lavado. Barra = 1 cm.

DISCUSSÃO

O sucesso do cultivo *in vitro* do material vegetal é influenciado pelo tamanho, idade, maneira pela qual o tecido é cultivado e as condições fisiológicas da planta doadora (GEORGE, 1963). Para sobrepor estes problemas, melhoria nas técnicas de morfogênese são necessárias para assegurar plântulas normais fisiologicamente, com melhor crescimento e para otimizar a sobrevivência no estágio *ex vitro* (ZOBAYED *et al.*, 2001).

A escolha do agente gelificante é também muito importante para a regeneração de plantas fisiologicamente superiores *in vitro* (DEBERGH, 1983). O meio deve ser firme o suficiente para suportar o explante, mas se for rígido demais pode impedir um contato adequado do explante com o meio e a absorção de nutrientes (BERRIOS *et al.*, 1999).

Sabendo-se destas condições, testou-se o efeito de diferentes agentes gelificantes na germinação das sementes e na indução de organogênese e embriogênese somática de explantes provenientes destas plântulas. Em relação à germinação, foram observadas respostas diferenciadas no número de plântulas e comprimento do cotilédone em função do agente gelificante. O número de plântulas obtidas no meio contendo Phytigel foi maior que os demais e os cotilédones foram maiores em relação ao comprimento. Porém, com estes resultados não foi possível correlacionar com o número de embriões formados, pois tanto o Phytigel quanto o Ágar, em relação a embriogênese, foram superiores ao Agargel quando a concentração de sais foi 100%.

Vários autores descreveram a influência da concentração (STOLTZ, 1971; TSUKAHARA e HIROSAWA, 1992; SAITO e NISHIMURA, 1994; KLIMASZEWSKA *et al.*, 2000), tipo (SAITO e NISHIMURA, 1994; KLIMASZEWSKA *et al.*, 2000) e marca comercial (KLIMASZEWSKA *et al.*, 2000) do agente gelificante na embriogênese somática.

KLIMASZEWSKA *et al.* (2000) observaram que o número de embriões somáticos maduros aumentou com o acréscimo da concentração do agente gelificante. Também, sugeriram que o efeito primário dos agentes gelificantes na maturação dos embriões somáticos é mediado pela restrição da disponibilidade da água no meio de cultivo no início e durante o período de cultivo.

A concentração de Gelrite também influenciou a formação de embriões somáticos normais, sendo que a concentração mais eficiente foi 1%. Em concentrações menores e em meio de cultivo líquido, os autores encontraram embriões pequenos e vitrificados e estes, em geral, não germinaram normalmente e desenvolveram calos (SAITO e NISHIMURA, 1994).

Não houve diferença em relação à indução de organogênese, resultado esse que contrasta com o de diversos autores. Dentre esses, os trabalhos de BERRIOS *et al.* (1999), que observaram diferença significativa entre genótipos e agentes gelificantes sobre a organogênese de *Helianthus annuus* L., e de SCHOLTEN e PIERIK (1998a), os quais demonstraram que a marca do Ágar teve efeito evidente no peso total e comprimento das raízes adventícias das plântulas de rosa Motrea.

A ausência de sacarose, o tipo de agentes gelificante e um número intermediário de trocas gasosas são características que aumentaram o crescimento e desenvolvimento de plântulas de *Coffea arabusta* propagadas *in vitro* (NGUYEN *et al.*, 1999). Além disso, estes autores relacionaram a formação de calo na base dos brotos com o aumento da concentração da combinação de sacarose e Ágar no meio de cultivo.

A influência citada acima é contraste com os resultados obtidos neste trabalho. Isso provavelmente se deve ao fato de que os diversos autores inocularam o explante sobre o meio contendo diferentes agentes gelificantes em várias concentrações e verificaram o efeito na morfogênese. Porém, neste trabalho foi analisada a ação do agente gelificante na obtenção de plântulas que serão utilizadas como fonte de explante e, não se observou efeito na indução de embriogênese e organogênese.

WILLIAMS (1993) cita que altas concentrações de sais no meio de cultivo têm efeitos inibitórios durante o crescimento das plântulas *in vitro* e o teor de sais encontrado no meio MS é alto. Deste modo, 75 % e 100 % de sais tiveram efeito

deletério no crescimento de ápices caulinares de berinjela, devido provavelmente a um efeito inibitório. O melhor tratamento observado foi quando adicionou-se metade da concentração dos sais no meio de cultivo.

O que está de acordo com CALDAS e CALDAS (1976). Estes autores observaram a concentração de nitrato em plantas de rosa 'Paul's Scarlet'. A concentração de 46,4 mM de nitrato foi ótima para o aumento na massa fresca. Porém os autores observaram inibição a 100 mM e perda de peso fresco a 215 mM. Já as concentrações menores que 46,4 mM de nitrato foram limitantes para o crescimento sob estas condições.

Durante o crescimento, os organismos vivos absorvem elementos químicos do ambiente nas proporções que ocorrem nos seus tecidos. Em microrganismos, plantas, assim como em cultura de células e tecidos, os elementos são absorvidos como pequenas moléculas ou como íons livres, afetando potencialmente a composição iônica do seu meio. Deve-se evitar estas alterações na composição do meio. Desta maneira, os elementos no meio de cultura devem estar disponíveis em proporções ditas como suficientes (SPAARGAREN, 1996).

Há boas evidências do envolvimento da concentração de gradientes e da difusão na absorção de minerais pelas plantas *in vitro*. A concentração de elementos nos tecidos é frequentemente proporcional a concentração inicial fornecida pelo meio (WILLIAMS, 1993).

Dessa maneira avaliou-se os teores de macro e micro-elementos em plântulas crescidas no meio de cultivo contendo sais MS metade da força e força completa, solidificado com Ágar, Agargel ou Phytigel, objetivando determinar a diferença de absorção dos nutrientes nas plântulas obtidas. E observou-se que todos os valores de macronutrientes foram menores, em todos os tratamentos avaliados.

MONTEIRO *et al.* (2000) utilizaram-se da análise mineral para comparar os requerimentos de macro e micronutrientes e, a partir dessa análise, os autores definiram um meio (MSM) com várias modificações nos teores de elementos químicos do meio básico MS. Em seguida, foram analisadas a concentração desses elementos nas folhas de plântulas crescidas nos meios MS e MSM. Porém, ao se comparar com os resultados obtidos no presente trabalho, observa-se que o

teor de boro (MSM) obtido por MONTEIRO *et al.* (2000) foi menor, enquanto que os valores de ferro (MS), manganês e zinco em ambos meios foram intermediários.

Quando os teores de macro e micronutrientes foram comparados com plantas de berinjela (JONES JR. *et al.*, 1991), os valores obtidos para macronutrientes, em geral, foram baixos. Isso pode ser devido ao tempo esperado para obter plântulas com tamanho suficiente para a análise dos elementos, cerca de 45 dias, o que levou a plantas a apresentarem características de deficiência, por excesso de tempo no qual foram mantidas no mesmo meio de cultivo. Porém, o mesmo não se observa para os micronutrientes.

Outro problema acerca do tipo de agente gelificante é o teor de impureza observado nos mesmos. Encontram-se diferenças na quantidade de impurezas e na capacidade de solidificar, dependendo do tipo de agente gelificante, marca e lote utilizado (GEORGE, 1993; SCHOLTEN e PIERIK, 1998a; KLIMASZEWSKA *et al.*, 2000).

Em um meio bem definido que são utilizados para cultivo *in vitro*, os agentes gelificantes são as maiores fontes de variação não conhecida (SCHOLTEN e PIERIK, 1998b). Em vários estudos, diferenças nas respostas das culturas a marcas ou tipos de ágar têm sido reportadas (DEBERGH, 1983).

Estas características podem alterar as propriedades químicas e físicas de um meio. Deste modo, objetivou-se quantificar o teor de elementos encontrados nos diferentes agentes gelificantes.

O Phytigel e o Gelrite são produtos com grandes quantidades de potássio, sódio, cálcio e magnésio, porém, são mais puros que o Ágar (GEORGE, 1993). Entretanto, no presente trabalho, observou-se que os teores encontrados para a maioria dos compostos, dentre eles: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e manganês, foram maiores no Phytigel, menores no Ágar e intermediários no Agargel, corroborados por KLIMASZEWSKA *et al.* (2000) e contrastantes com GEORGE (1993).

No presente trabalho, o único elemento no qual o ágar apresentou maior concentração foi o zinco. Enquanto o enxofre, ferro e boro foram os mais concentrados no Agargel.

Estas impurezas observadas nos agentes gelificantes são importantes, pois influenciam as respostas dos explantes. Essa influência pode ser positiva, possuindo função nutricional (WILLIAMS, 1993; GEORGE, 1993), ou ainda, ser responsável pelas desordens no crescimento, tal como clorose e necrose (SCHOLTEN e PIERIK, 1998a), justificando novos estudos.

Além da análise química, testou-se a pureza do agente gelificante com gotas de AgNO_3 . Segundo SCHOLTEN e PIERIK (1998a), com esse teste a contaminação com cloro pode ser facilmente visualizada, pois o AgNO_3 reage com o Cl formando um precipitado de AgCl . Sendo que a presença de cloro parece ser um bom marcador da qualidade e pureza do Ágar, o que está de acordo com o observado.

Além disso, ao contrário do que foi observado por REIS *et al.* (2005), foi possível correlacionar a pureza do agente gelificante e o desempenho na germinação. Essa mesma correlação não foi observada para a embriogênese somática e para a organogênese.

Outra observação quanto ao teor de impurezas foi que a lavagem dos agentes gelificantes diminuiu a concentração de cloro. Porém, o cloro não foi retirado completamente do Agargel com as três lavagens. Sugere-se que um número maior de lavagens poderia levar ao resultado obtido por SCHOLTEN e PIERIK (1998b), ou então, os componentes do Agargel podem ligar ao cloro impedindo uma redução no seu nível durante as lavagens.

Outra característica física descrita por alguns autores é a taxa de difusão, que está relacionada à absorção dos nutrientes pelo explante (WILLIAMS, 1993; BERRIOS *et al.*, 1999) e absorção de reguladores de crescimento (BERRIOS *et al.*, 1999). Desse modo, o agente gelificante pode modificar a disponibilidade de substâncias solúveis por meio de interações químicas (BERRIOS *et al.*, 1999).

A taxa de difusão de íons no gel difere entre os agentes gelificantes (SCHOLTEN e PIERIK, 1998a). Porém, devido ao alto teor de impurezas encontrado no Ágar e Agargel, não foi possível determinar a taxa de difusão. Para determinar a taxa de difusão, uma gota de iodeto de potássio (KI) foi introduzida utilizando-se uma pipeta automática dentro do meio. Este se constituiu de água e macronutrientes (contendo CaNO_3 , ao invés de CaCl_2) solidificados com Ágar,

Agargel e Phytigel. Essa gota encontrava-se a 1,5; 2,0 e 2,5 cm de distância de uma gota de AgNO_3 . Observou-se que o AgNO_3 não difundiu devido, provavelmente, aos teores de cloro; com a lavagem observou o início de difusão no Ágar.

Conclui-se que o tipo de agentes gelificantes, a concentração dos sais no meio e a interação entre ambos podem influenciar a germinação, o crescimento das plântulas, a organogênese e a embriogênese somática. A qualidade e o grau de pureza dos agentes gelificantes influenciam a morfogênese. Porém não foi observada influência dos agentes gelificantes na obtenção de plântulas que serão utilizadas como fonte de explante.

Desse modo sugere-se a utilização de meio MS completo, pois apesar das plântulas estarem vigorosas no meio MS contendo a metade da concentração, o desenvolvimento é mais rápido no meio MS completo. Não houve diferença quando considerada a concentração de sais no meio na indução de embriogênese somática, quando utilizadas essas plântulas. Porém, a utilização de Phytigel, apesar de mais caro, é recomendada, para a obtenção de plântulas vigorosas como fonte de explantes na indução de organogênese. Assim como é sugerida a utilização de metade da concentração para o alongamento utilizando-se de ápices caulinares de berinjela.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERRIOS, E.F., L. GENTZBITTEL, H. SERIEYS, G. SALIBERT, A. SARRALI. 1999. Influence of genotype and gelling agents on *in vitro* regeneration by organogenesis in sunflower. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 59:65-69.
- BERUTO, M., P. CURIR, P. DEBERGH. 1999. Influence of agar on *in vitro* cultures: I. Physicochemical properties of agar and agar gelled media. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 35:86-93.
- BORNMAN, C.H., T.C. VOGELMANN. 1984. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 61:505-512.
- CALDAS, R.A., L.S. CALDAS. 1976. Nitrate, ammonium and kinetin effects on growth and enzyme activities of Paul's scarlet rose callus. *Physiol. Plant.* 37:111-116.
- CRUZ, C.D. 2001. Programa GENES. Editora UFV. Release Versão Windows. Editora UFV, Viçosa. CRUZ, C.D.
- DEBERGH, P. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.* 59:270-276.
- GAMBORG, O.L., R.A. MILLER, K. OJIMA. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- GEORGE, E.F. 1993. *Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology.* 2 ed. Exegetics Limited, Edington, England.
- GLEDDIE, S., W. KELLER, G. SETTERFIELD. 1983. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *Solanum melongena* (eggplant). *Can. J. Bot.* 61:656-666.
- JONES JR., B.W. BENTON, H.A. MILLS. 1991. *Plant Analysis Handbook: 1. Methods of plant analysis and interpretation.* Micro-Macro Publishing, Georgia.
- KLIMASZEWSKAY, K., M. BERNIER-CARDOUL, D.R. CYR, B.C.S. SUTTON. 2000. Influence of gelling agents on culture medium gel strength,

water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobum* L. In *Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 36:279-286.

LAINE, E., F. LAMBLIN, J. LACOUX, P. DUPRE, D. ROGER, D. SIHACHAKR, A. DAVID. 2000. Gelling agent influences the detrimental effect of kanamycin on adventitious budding in flax. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 63:77-80.

MONTEIRO, A.C.B.A., E.N. HIGASHI, A.N. GONÇALVES, and A.P.M. RODRIGUEZ. 2000. A novel approach for the definition of the inorganic medium componentes for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). In *Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 36:527-531.

MURASHIGE, T., F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

NAVATEL, J.C., L. BOURRAIN. 1994. Influence of the physical structure of the medium on *in vitro* rooting. *Adv. Hort. Sci.* 8:57-59.

NGUYEN, Q.T., T. KOZAI, U.V. NGUYEN. 1999. Effects of sucrose concentration, supporting material and number of air exchanges of the vessel on the growth of *in vitro* coffee plantlets. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 58:51-57.

PICOLI, E.A.T. 2000. Morfogênese *in vitro* e transformação genética de berinjela (*Solanum melongena* L. cv. Embu) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

REIS, L.B. 2001. Morfogênese *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada ao etileno e a agentes gelificantes. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

REIS, L.B., R.R. COSTA, W.C. OTONI. 2005. Influência de agentes gelificantes na organogênese *in vitro* de explantes juvenis de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). *Plant Cell Cult. & Microp.* 1:80-88.

SAITO, T., S. NISHIMURA. 1994. Improved culture conditions for somatic embryogenesis using an aseptic ventilative filter in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Sci.* 102:205-211.

SCHOLTEN, H.J., R.L.M. PIERIK. 1998a. Agar as a gelling agent: differential biological effects *in vitro*. *Sci. Hort.* 77:109-116.

SCHOLTEN, H.J., R.L.M. PIERIK. 1998b. Agar as a gelling agent: chemical and physical analysis. *Plant Cell Rep.* 17:230-235.

SHA VALLI KHAN, P.S., J.F. HAUSMAN, K.R. RAO. 1999. Effect of agar, MS medium strength, sucrose and polyamines on *in vitro* rooting of *Syzygium alternifolium*. *Biol. Plant.* 42:333-340.

SPAARGAREN, D.H. 1996. The design of culture media based on the elemental composition of biological material. *J. Biotechnol.* 45:97-102.

STOLTZ, L.P. 1971. Agar restriction of the growth of excised mature Iris embryos. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 96:681-684.

TREMBLAY, L., F.M. TREMBLAY. 1991. Effects of gelling agents, ammonium nitrate, and light on the development of *Picea mariana* (Mill) B.S.P. (black spruce) and *Picea rubens* Sarg. (red spruce) somatic embryos. *Plant Sci.* 77:233-242.

TSUKAHARA, M., T. HIROSAWA. 1992. Simple dehydration treatment promotes plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus. *Plant Cell Rep.* 11:550-553.

WHITE, P.R. 1954. The cultivation of animal and plant cell. 2nd ed. New York: Ronald Press. p.57-63.

WILLIAMS, R.R. 1993. Mineral nutrition *in vitro* - a mechanistic approach. *Aust. J. Bot.* 41:237-251.

ZOBAYED, S.M.A., F. AFREEN, T. KOZAI. 2001. Physiology of *Eucalyptus* plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 37:807-813.

Capítulo III

Influência do precursor ACC e dos inibidores AVG e STS do etileno na morfogênese *in vitro* de berinjela (*Solanum melongena* L.)

RESUMO

Neste trabalho avaliou-se o efeito do precursor ACC e dos inibidores AVG e STS do etileno na embriogênese somática e na organogênese de berinjela. Sementes do cultivar Embu foram desinfestadas e inoculadas em meio composto de sais MS, vitaminas B₅, 100 mg L⁻¹ de inositol, 2% de sacarose, solidificado com 6,5 g L⁻¹ de ágar (Merck[®]). Em seguida, os cotilédones ou hipocótilos provenientes de plântulas com aproximadamente 15 dias foram inoculados em meio MS semelhante ao descrito acima, ao qual foram acrescentados 10 mg L⁻¹ de ANA ou 0,1 mg L⁻¹ de AIA nos meios para indução de embriogênese ou organogênese, respectivamente. Foram adicionados ACC, AVG e STS, nas concentrações de 0, 3, 10 e 30 µM. Além disso, testou-se o Retain[®], (15% de AVG e 85 % de ingrediente inerte) nas mesmas concentrações. No meio contendo 10 mg L⁻¹ de ANA, observou-se pela equação de regressão que para a característica frequência de embriões, com a adição de ACC ao meio houve um aumento até próximo a 20 µM seguido de uma redução, e com a adição de AVG obteve-se um pico em 3 µM, enquanto que na presença de STS houve uma queda. No meio indutor de organogênese, com o aumento da concentração do ACC e do AVG observou-se redução no peso da matéria fresca e na frequência de gemas, de ramos e de primórdios radiculares. Além disso, resultou em aumento no diâmetro dos explantes. A suplementação de STS no meio induziu a um crescimento na característica frequência de ramos e um decréscimo nas demais características. Ao se comparar os resultados obtidos com AVG, observa-se que houve diminuição nas características quando adicionado o Retain[®].

Palavras-chave: ácido aminociclopropano -1- carboxílico (ACC), Aminoetoxivinilglicina (AVG), Tiosulfato de prata (STS), Retain[®], embriogênese somática e organogênese.

INTRODUÇÃO

Diversos fatores estão envolvidos no controle da morfogênese *in vitro*, dentre os quais, a presença de reguladores de crescimento como as auxinas e citocininas. O etileno é o único regulador encontrado na forma gasosa, que embora não seja suplementado, acumula-se facilmente nos recipientes de cultura, juntamente com outros compostos voláteis (REIS *et al.*, 2003). Como a sua produção parece ser universal nas células e tecidos de plantas intactas (TAIZ e ZEIGER, 2004), o etileno acumula na atmosfera do frasco e pode influenciar o crescimento e morfogênese do explante, podendo estar relacionado com vários fenômenos indesejáveis observados em tecidos vegetais cultivados *in vitro* (CHI *et al.*, 1991). Além disso, tecidos lesionados não-senescentes ou mecanicamente perturbados aumentam temporariamente a produção de etileno e, posteriormente, retornam a níveis basais (TAIZ e ZEIGER, 2004).

O etileno acumulado pode influenciar as diferentes respostas morfogênicas em tecidos vegetais cultivados *in vitro*. Vários estudos buscando compreender a função do etileno *in vitro* foram realizados em diversas espécies; dentre estes pode-se citar: suspensão celular de *Nicotiana tabacum* (PARK e LEE, 1994); crescimento e diferenciação de hipocótilos de *Cicer arietinum* (CHANDRA *et al.*, 1997); rizogênese em *Bixa orellana* (PAIVA-NETO, 2002); e embriogênese somática em embriões imaturos de *Carica papaya* (KOEHLER, 2004). Em cada um destes estudos, o etileno estimula ou inibe o crescimento e diferenciação dos explantes, dependendo da espécie considerada, microambiente dos frascos e propriedades físicas (MATTHIJS *et al.*, 1995).

A cultura de tecidos e células vegetais também permite estudos utilizando precursores e inibidores da via do etileno, suplementando o meio com ACC (ácido 1-aminociclopropano carboxílico), o precursor imediato de biossíntese, ou com a presença de inibidores de biossíntese, como o AVG (aminoetoxivinilglicina). O

qual é considerado um potente inibidor, bloqueando a formação do ACC a partir do SAM (S-adenosilmetionina). Altas concentrações de íons cobalto afetam a síntese de etileno, pois inibem a ação da oxidase do ACC, impedindo a conversão do ACC em etileno, além de produzir baixas concentrações de oxigênio, acetilcolina e agentes quelantes. Além disso, íons prata, na forma de tiosulfato (STS; AgS_2O_3) e /ou nitrato (AgNO_3) controlam a ação fisiológica do etileno. Altas concentrações de dióxido de carbono podem também suprimir a ação fisiológica do etileno (GEORGE, 1993).

Sabendo-se da influência do etileno no cultivo *in vitro*, o presente trabalho buscou avaliar o efeito do etileno na embriogênese somática e na organogênese em berinjela (*Solanum melongena*), suplementando o meio com inibidores da biossíntese (AVG e seu produto comercial Retain[®]) e da ação (STS) e o precursor (ACC) deste regulador vegetal.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do material vegetal e germinação *in vitro*

As sementes de berinjela (*Solanum melongena* L.) cultivar Embu (Horticeres[®]), utilizadas nos experimentos, foram obtidas no comércio local de Viçosa, MG. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II, no Núcleo de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

As sementes foram embebidas por 72 horas em água deionizada e estéril, submetidas a desinfestação a cada 24 horas, ao longo deste período. Neste processo, foram imersas em álcool 70% por 1 minuto, seguido por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 2,5 %, acrescido de 2 gotas de Tween 20 para cada 100 mL de solução, e enxaguadas em água deionizada e estéril três vezes seguidas (PICOLI, 2000).

Posteriormente, as sementes foram inoculadas em meio composto de sais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), vitaminas B₅ (GAMBORG *et al.*, 1968), 100 mg L⁻¹ de inositol e 2% de sacarose, solidificado com 6,5 g L⁻¹ de ágar (Merck[®]), com o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121 °C, 1 atm durante 20 minutos). Foi distribuído 40 mL de meio de cultivo em cada frasco de vidro (12 cm de altura e 6 cm de largura) e cerca de 10 sementes foram inoculadas por recipiente.

As culturas foram mantidas sob irradiância de $37 \pm 4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil), temperatura de 26 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas.

2.2. Indução de embriogênese somática e organogênese

Oito a dez cotilédones ou hipocótilos provenientes de plântulas com aproximadamente 15 dias foram utilizados como fonte de explantes para embriogênese ou organogênese, respectivamente. Os cotilédones foram seccionados longitudinalmente e inoculados em meio de cultivo com a face abaxial voltada para o meio de cultivo. Segmentos de hipocótilo com cerca de 1 cm de comprimento foram inoculados em meio de cultivo seguindo a orientação base-ápice.

O meio composto de sais MS, vitaminas B₅, 100 mg L⁻¹ de inositol, 2% de sacarose, 6,5 g L⁻¹ de ágar (Merck® KgaA, Germany) foi utilizado. Acrescentou-se como regulador de crescimento 10 mg L⁻¹ de ANA (ácido α -naftaleno acético) ou 0,1 mg L⁻¹ de AIA (ácido indolil-3-acético) nos meios para indução de embriogênese ou organogênese, respectivamente. O ANA foi adicionado antes da autoclavagem e o AIA, após. O pH foi ajustado para 5,8 e o meio vertido em placas de Petri estéreis de 9 cm de diâmetro e 1,2 cm de altura. As placas foram mantidas sob as condições de cultivo citadas no item 2.1.

2.2.1. Indução de embriogênese somática e organogênese em presença de inibidores de etileno (AVG e STS) e do precursor ACC

Para avaliar o efeito do precursor ACC e dos inibidores AVG e STS, estes foram adicionados ao meio indutor, descrito no item 2.2, alíquotas de soluções-estoque filtro-estéreis, correspondentes às concentrações de 0, 3, 10 ou 30 μ M de ACC (ácido aminociclopropano -1- carboxílico), AVG (Aminoetoxivinilglicina) ou STS (Tiosulfato de prata), após autoclavagem. As soluções de ACC e AVG foram filtro-esterilizadas em membrana com poros de 0,22 μ m e 2,5 cm de diâmetro (Millex-GS®, Millipore, EUA). O STS foi preparado segundo a metodologia descrita por REID *et al.* (1980).

2.2.2. Retain[®] na embriogênese somática e organogênese

Para avaliar o efeito do Retain[®] (Valent BioSciences, Illinois, EUA) na morfogênese, cotilédones ou hipocótilos foram inoculados em meio indutor de embriogênese ou organogênese, respectivamente, como descrito no item 2.2. Ao meio foi acrescentado Retain[®], que contém 15% de AVG e 85 % de ingrediente inerte, sendo que a concentração final obtida no meio foi 0, 3, 10 ou 30 μM de AVG. O produto comercial foi gentilmente cedido pelo Sr. Luiz Fernando Mróz da empresa Sumitomo Corporation do Brasil.

2.3. Critérios de avaliação e análise estatística

Após 30 dias, foram avaliados o peso da matéria fresca, a consistência, a cor e a intensidade do calejamento, o número de embriões totais, o número de primórdios radiculares e a presença de necrose e de hiperhidricidade sob condições de indução de embriogênese somática. Para condições de indução de organogênese, foram observados aos 30 dias: o peso da matéria fresca, a coloração, a intensidade e a consistência do calejamento, o número de ramos, de gemas e de raízes e se estes estavam hiperhídricos.

Os experimentos foram repetidos e seguiram o delineamento inteiramente casualizados (DIC). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e para a comparação entre as médias dos tratamentos foi realizado o teste de Tukey a 5% de significância para todos os experimentos, exceto os experimentos utilizando-se ACC, AVG e STS, no qual foi realizada uma ANOREG (análise de variância da regressão) e após foi determinado o F e o R_2 . Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa GENES versão Windows/2004.2.1, desenvolvido por CRUZ (2001).

RESULTADOS

3.1. Efeito dos inibidores AVG e STS e do precursor ACC de etileno na embriogênese somática e organogênese

A adição do precursor ACC e dos inibidores da biossíntese, AVG, e da ação, STS, não inibiu a aquisição de competência embriogênica em cotilédones de *S. melongena*. Observou-se que em relação ao controle, a adição de 3 e 10 μM de ACC ao meio de indução aumentou a frequência de embriões (Figura 1B) e de primórdios radiculares (Figura 1C), porém pequena redução foi observada com a adição de 30 μM . Para a característica peso da matéria fresca observou-se que o aumento da concentração de ACC não modifica a resposta do explante (Figura 1A).

A adição de AVG ao meio contendo 10 mg L^{-1} de ANA levou ao aumento no número de primórdios radiculares (Figura 1F). Porém, a frequência de embriões elevou com a adição de 3 μM de AVG e reduziu com o aumento da concentração (Figura 1E). Já para a característica peso da matéria fresca, houve uma redução com o aumento da concentração do AVG (Figura 1 D).

A presença de STS no meio reduziu a frequência de embriões e o peso da matéria fresca (Figura G e H). Contudo, a adição de 3 e 10 μM de STS aumentou a frequência de primórdios radiculares e reduziu drasticamente com a adição de 30 μM (Figura 1I).

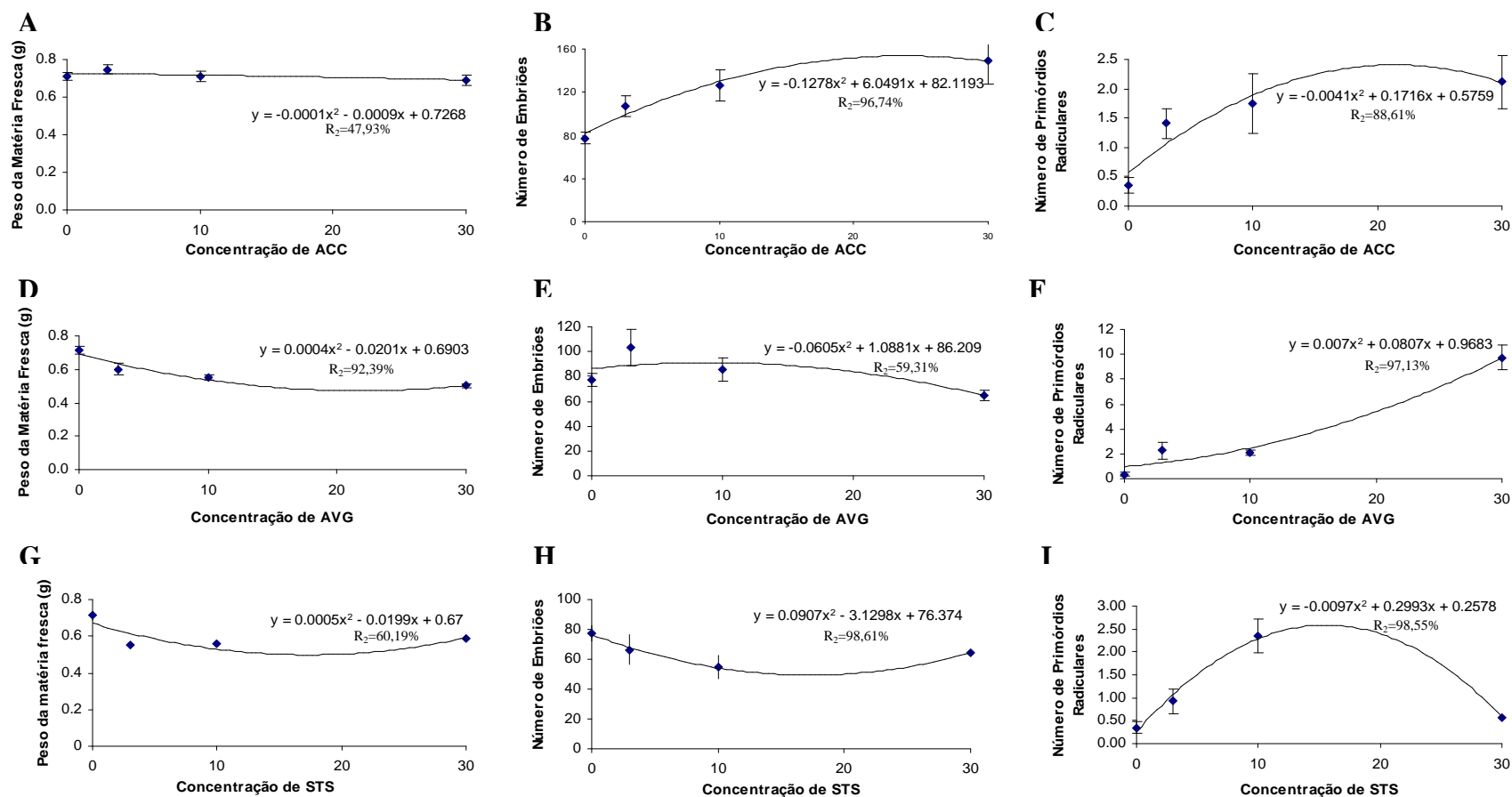


Figura 1. Efeitos do precursor ACC e dos inibidores AVG e STS sobre a indução de embriogênese somática em cotilédones de *Solanum melongena* L. A, D e G – Peso da matéria fresca; B, E e H – Frequência de embriões; C, F e I – Frequência de primórdios radiculares. A, B e C – respostas observadas no meio indutor contendo ACC; D, E e F – respostas observadas no meio contendo AVG; G, H e I – respostas observadas no meio contendo STS. Gráfico apresentando os valores médios, erro padrão da média e a reta da equação de regressão. As barras verticais indicam os erros padrões da média.

No meio contendo $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA, a incorporação de ACC ao meio, reduziu o número e tamanho dos brotos observados, porém aumentou a intensidade do calejamento (Figura 2 E-G), assim como diminuiu o peso da matéria fresca (Figura 4A) e a frequência de gemas (Figura 3B), primórdios radiculares (Figura 3C) e de ramos (Figura 3A), porém o último o aumento ocorreu a partir de $10 \text{ }\mu\text{M}$, além disso, resultou em um aumento no diâmetro dos explantes (Figura 4B).

Com o aumento da concentração de AVG, observou-se uma coloração amarelada nos brotos, sendo que não houve formação de brotos com $30 \text{ }\mu\text{M}$ (Figura 2B-D).

Exceto para o diâmetro dos explantes, o aumento da concentração de AVG reduziu todas as demais características analisadas. Para o diâmetro dos explantes, houve aumento do diâmetro com adição de 3 e $10 \text{ }\mu\text{M}$ de AVG e uma queda drástica com a suplementação de $30 \text{ }\mu\text{M}$ de AVG (Figura 3 D-F; Figura 4 C-D).

A suplementação de STS no meio induziu incremento na frequência de ramos, e decréscimos em todas as outras características, porém encontrou-se um valor baixo de R_2 para frequência de primórdios radiculares, diâmetro do explante e peso da matéria fresca, não permitindo a adequação de uma equação da reta (Figura 3 G-I; Figura 4 E-F). Enquanto que, visualmente, com a adição de STS observou-se que o tamanho e o número de brotos aumentaram, assim como a coloração que ficou mais esverdeada. Em compensação à intensidade de calejamento diminuiu (Figura 2 H-J).

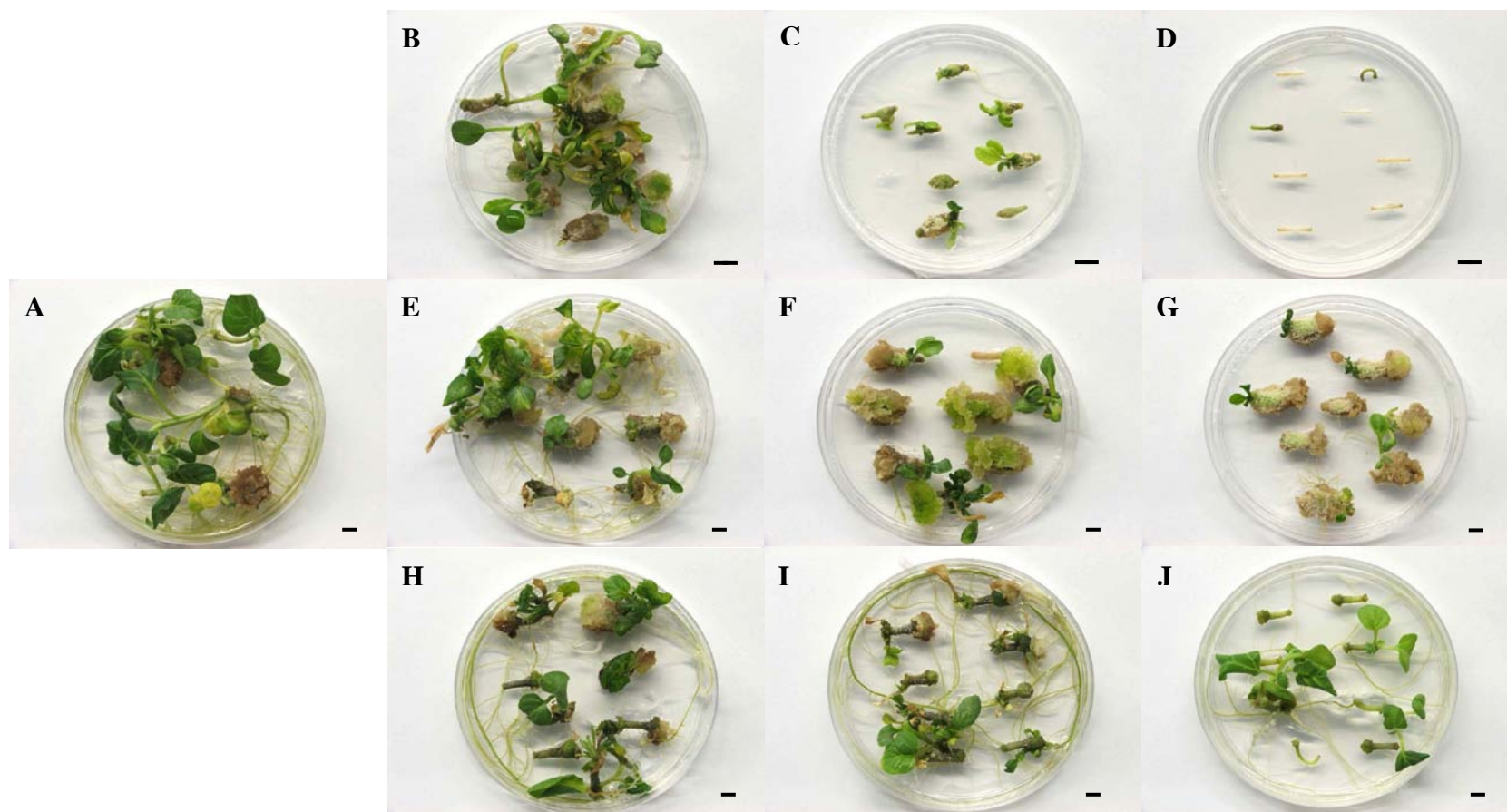


Figura 2. Efeitos do precursor ACC e dos inibidores AVG e STS sobre a indução de organogênese em hipocótilos de *Solanum melongena* L. ‘Embu’ após 30 dias de cultivo. A – tratamento controle; B – 3 μM de AVG; C – 10 μM de AVG; D – 30 μM de AVG; E – 3 μM de ACC; F – 10 μM de ACC; G – 30 μM de ACC; H – 3 μM de STS; I – 10 μM de STS; J – 30 μM de STS. Barras – 1 cm.

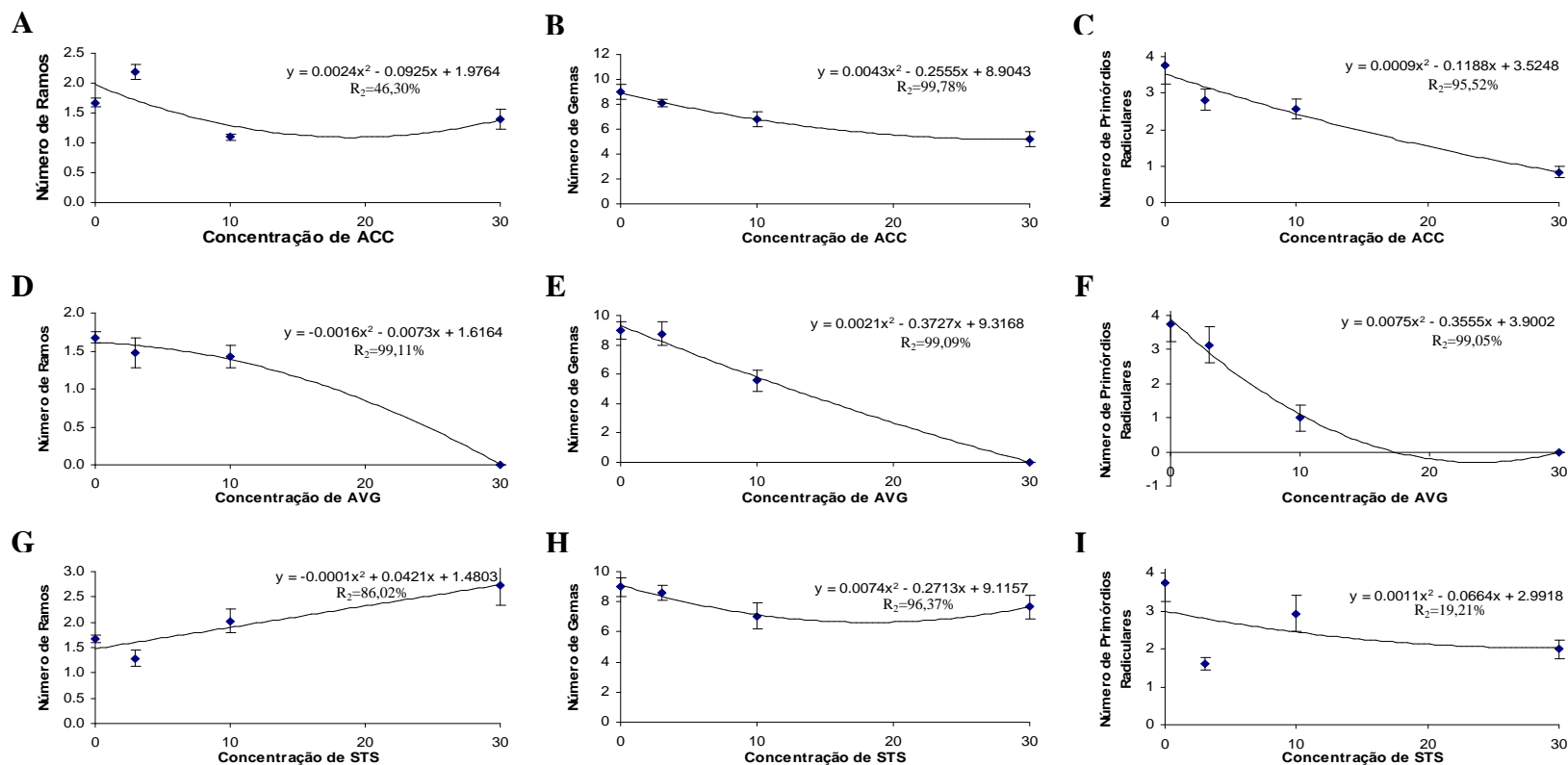


Figura 3. Efeitos do precursor ACC e dos inibidores AVG e STS sobre a indução de organogênese em hipocótilos de *Solanum melongena* L. A, D e G – Frequência de Ramos; B, E e H – Frequência de gemas; C, F e I – Frequência de primórdios radiculares. A, B e C – respostas observadas no meio indutor contendo ACC; D, E e F – respostas observadas no meio contendo AVG; G, H e I - respostas observadas no meio contendo STS. Gráfico apresentando os valores médios, erro padrão da média e a reta da equação de regressão. As barras verticais indicam os erros padrões da média.

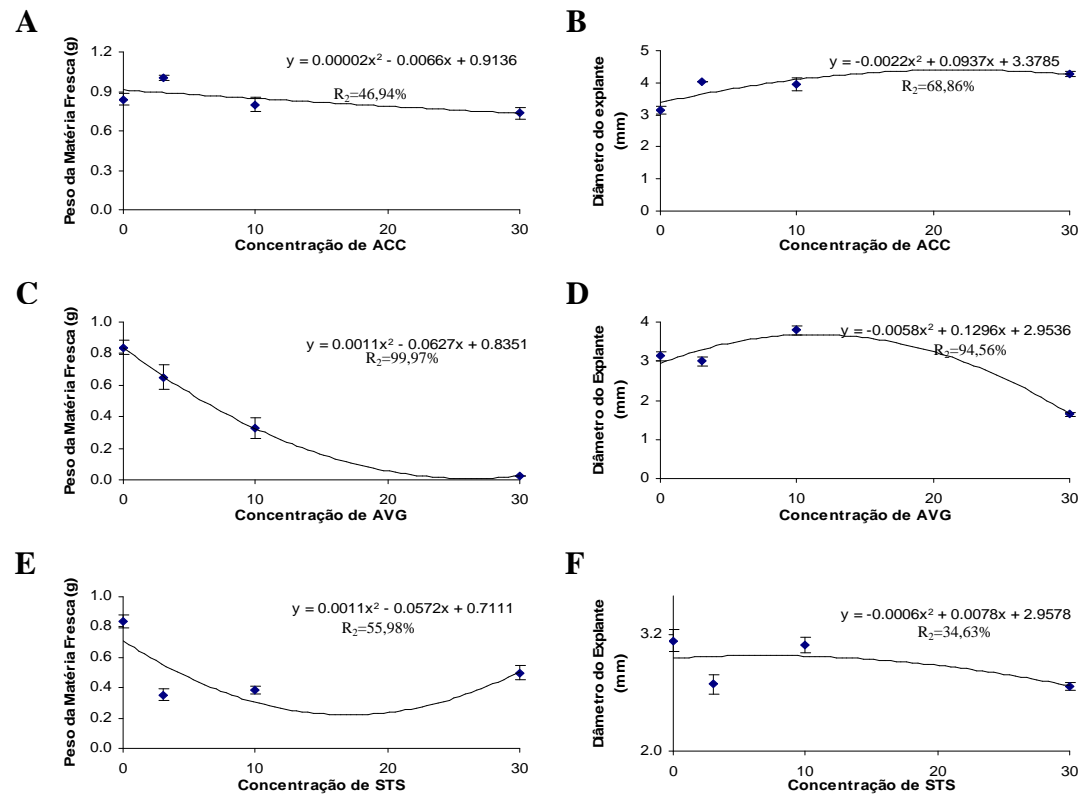


Figura 4. Efeitos do precursor ACC e dos inibidores AVG e STS sobre a indução de organogênese em hipocótilos de *Solanum melongena* L. ‘Embu’. A, C e E – Peso da matéria fresca; B, D e F – Diâmetro do explante; A e B – respostas observadas no meio indutor contendo ACC; C e D – respostas observadas no meio contendo AVG; E e F - respostas observadas no meio contendo STS. Gráfico apresentando os valores médios, erro padrão da média e a reta da equação de regressão. As barras verticais indicam os erros padrões da média.

3.2. Efeito do Retain[®] na embriogênese somática e organogênese

Exceto para o número de primórdios radiculares em meio contendo 0,1 mg L⁻¹ de AIA, as demais características avaliadas nos meios indutores de embriogênese – MS e 10 mg L⁻¹ de ANA (Tabela 1) e de organogênese - MS 0,1 mg L⁻¹ de AIA (Tabela 2) apresentaram modificações morfológicas significativas mediante a adição do Retain[®]. Com o aumento da concentração de Retain[®] observou-se concomitante diminuição da intensidade de calejamento dos explantes (Figura 5).

No meio indutor de embriogênese somática observou-se queda na massa fresca dos explantes com o aumento da concentração de Retain[®] (Figura 6A). A frequência de embriões manteve-se com o acréscimo de 3 µM de Retain[®], porém apresentou reduções significativas com a elevação das concentrações desse produto (Figura 6B). Todavia para a frequência de primórdios radiculares, observou-se maior indução em 10 µM de Retain[®], porém 3 e 30 µM foram significativamente superiores ao tratamento controle (Figura 6C).

Tabela 1. Resumo da análise de variância das características observadas no meio de indução de embriogênese somática em *Solanum melongena* L. ‘Embu’.

Fontes de Variação	GL	QM		
		PMF	NE	NPR
Concentração de Retain [®]	3	0,53*	13070,73*	208,95*
Resíduo	16	0,01	1075,90	7,46
Coefficiente de Variação (%)		19,39	54,99	32,52

* Significativo a $p < 0,05$ pelo teste F. PMF = peso da matéria fresca; NE = número de embriões; e, NPR = número de primórdios radiculares.

Tabela 2. Resumo da análise de variância das características observadas no meio de indução de organogênese em *Solanum melongena* L. ‘Embu’.

Fontes de Variação	GL	QM				
		PF	NR	NG	NPR	DIAM
Concentração de Retain [®]	3	0,13*	6,98*	55,02*	3,29ns	2,54*
Resíduo	16	0,01	0,20	5,16	0,76	0,25
Coefficiente de Variação (%)		74,37	32,15	42,92	104,56	20,19

* Significativo a $p < 0,05$ pelo teste F. PMF = peso da matéria fresca; NR = número de ramos; NG = número de gemas; NPR = número de primórdios radiculares; DIAM = diâmetro do explante.

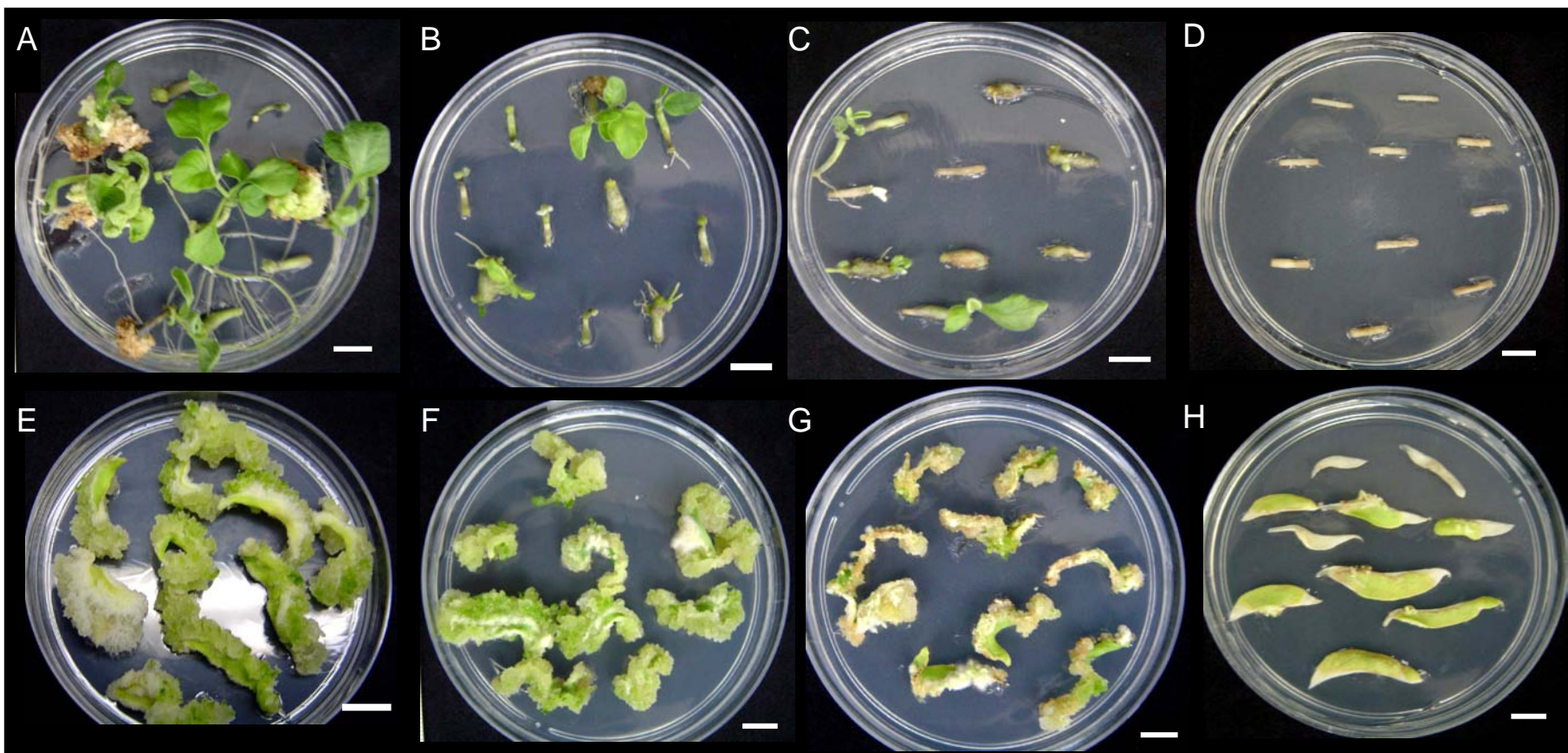


Figura 5. Efeito do Retain[®] sobre a indução de organogênese (A-D) ou embriogênese somática (E-H) em hipocótilos e cotilédones, respectivamente, de *Solanum melongena* L. 'Embu'. A e E – tratamento controle; B e F – 3 μM de AVG; C e G – 10 μM de AVG; D e H - 30 μM de AVG. Barra = 1 cm.

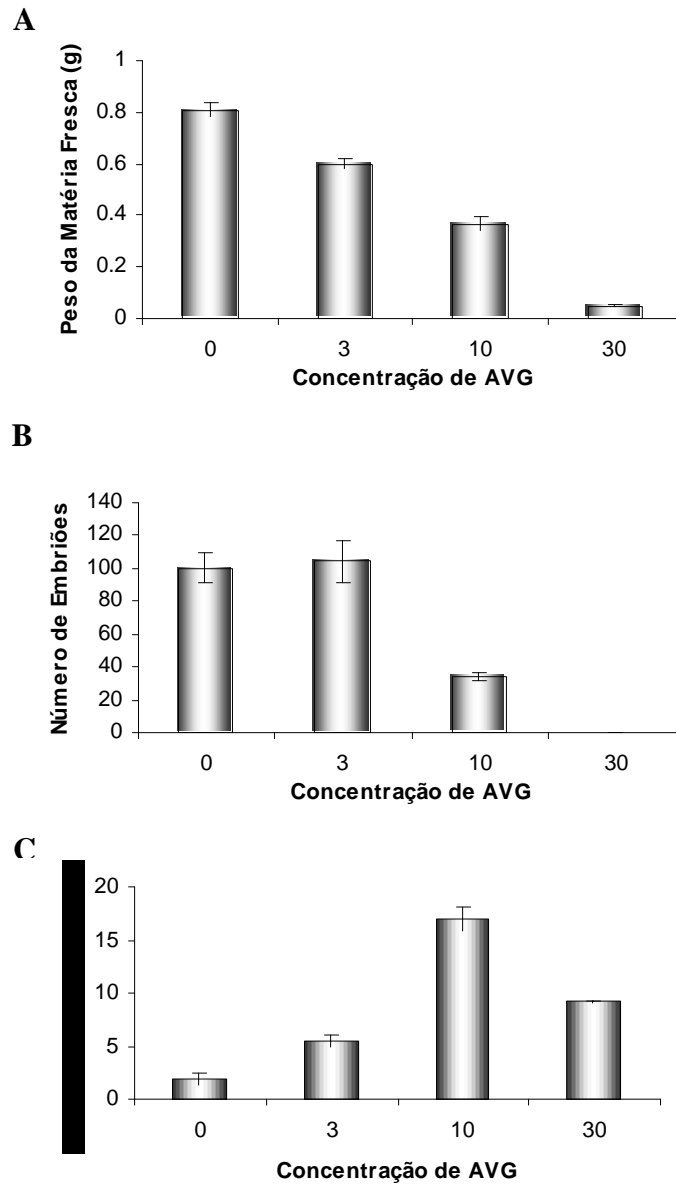


Figura 6. Efeito do Retain[®] sobre a indução de embriogênese somática em cotilédones de *Solanum melongena* L. A – peso da matéria fresca; B – Frequência de embriões somáticos; C – Frequência de primórdios radiculares. As barras verticais indicam os erros padrões da média.

Ao se comparar os resultados obtidos com o AVG e o Retain[®] observa-se que em ambos houve uma queda no peso da matéria fresca e na frequência de embriões com o aumento da concentração, porém quando utilizado o Retain[®] observa-se que esta diminuição é maior e estatisticamente diferente (Figura 1 D-F; Figura 6 A e B). Em relação à frequência de primórdios radiculares, observa-se uma resposta semelhante, exceto quando foi adicionado 10 μM , no qual ao se utilizar o AVG encontrou-se em média 2,1 primórdios, enquanto que quando utilizou-se Retain[®] obteve-se 17,0 (Figura 1F e Figura 6C).

Em meio contendo 0,1 mg L^{-1} de AIA, a suplementação com Retain[®] resultou em uma redução significativa no peso da matéria fresca, na frequência de ramos e no diâmetro do explante (Figura 5A-D; Figura 7A, B e Figura 8B). Na característica frequência de primórdios não houve diferença significativa, devido principalmente a grande variação observada dentro dos tratamentos (Figura 8A). O aumento da concentração de Retain[®] não influenciou a formação de gemas quando foi acrescentado 3 e 10 μM , porém, com o acréscimo para 30 μM , observou-se uma diminuição drástica (Figura 7C).

Comparando-se AVG e Retain[®] no meio contendo 0,1 mg L^{-1} de AIA, observou-se que quando adicionado Retain[®] houve uma queda para a característica peso fresco da matéria seca (Figura 4C e 7A), enquanto que a frequência de ramos e de primórdios radiculares foi duas vezes maior (Figura 3D, 3F, 7B e 8A). Para o diâmetro do explante em AVG houve um aumento com o acréscimo da concentração, seguido de uma queda, enquanto em meio contendo Retain[®] observou-se uma redução com o aumento da concentração (Figura 3D-F; Figura 4D; Figura 8B).

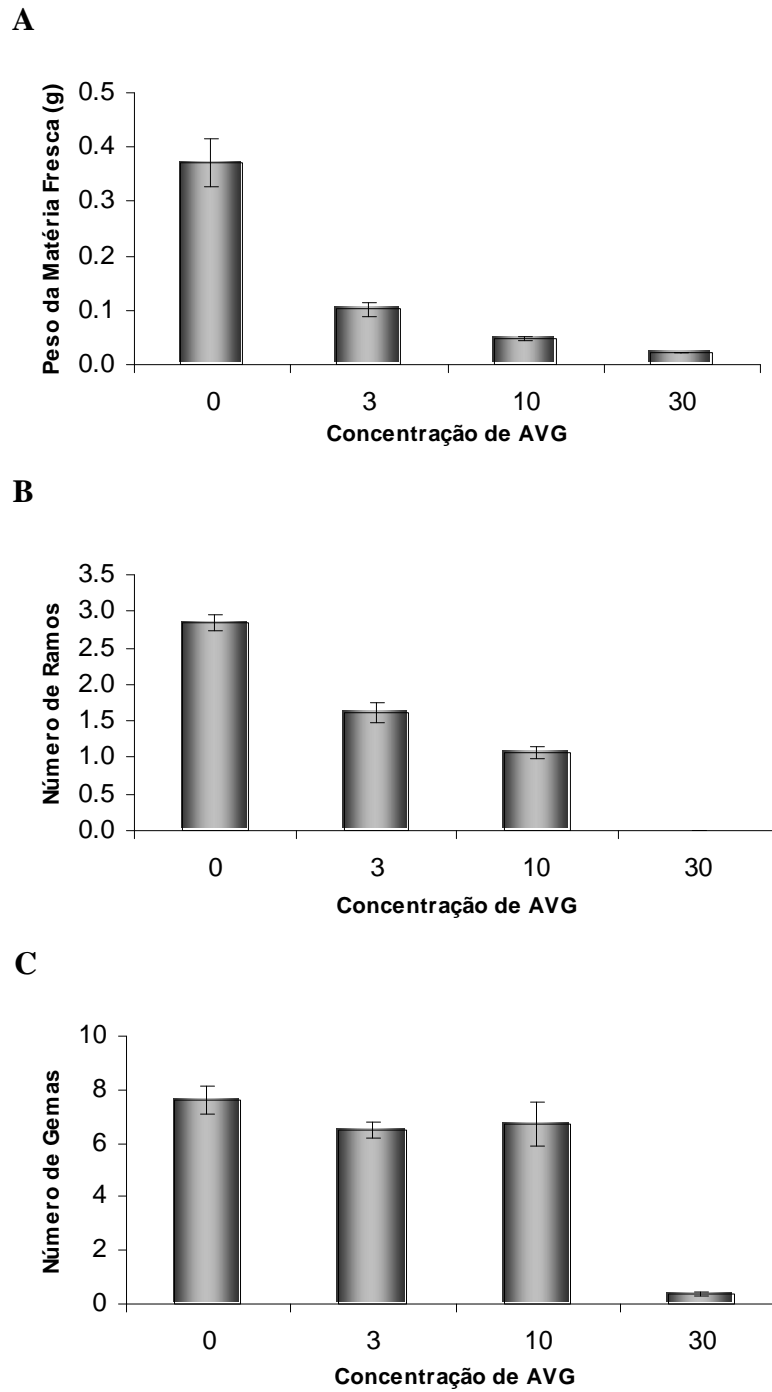
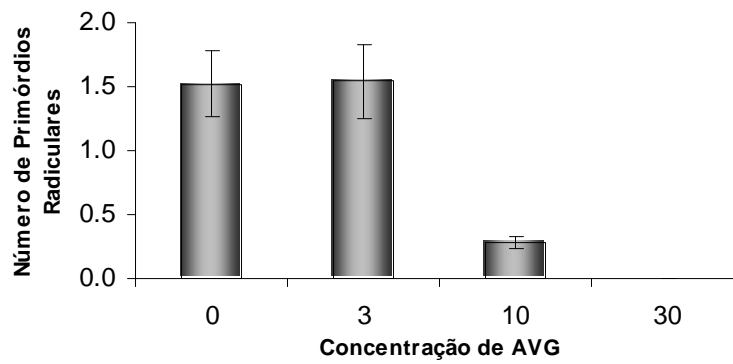


Figura 7. Efeito do Retain[®] sobre a indução de organogênese em hipocótilos de *Solanum melongena* L. A – peso da matéria fresca; B – Frequência de ramos; C – Frequência de gemas. As barras verticais indicam os erros padrões da média.

A



B

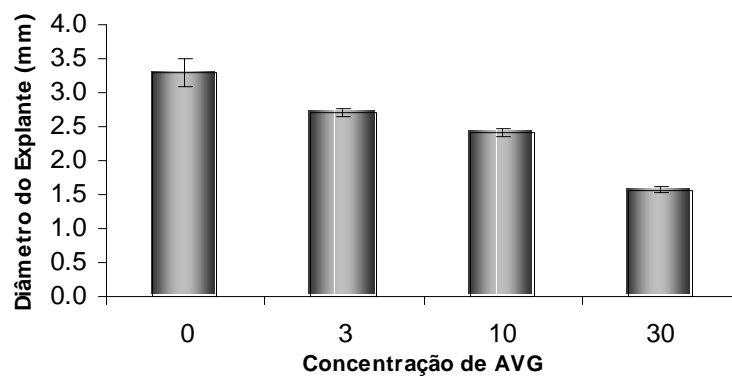


Figura 8. Efeito do Retain[®] sobre a indução de organogênese em hipocótilos de *Solanum melongena* L. A – frequência de primórdios radiculares; B – Diâmetro do explante. As barras verticais indicam os erros padrões da média.

DISCUSSÃO

O etileno é produzido por tecidos vegetais e a produção é temporariamente aumentada quando eles são feridos, conseqüentemente, há um aumento significativo durante o isolamento dos explantes (GEORGE, 1993; INGEMARSSON e BOLLMARK, 1997). Além disso, a concentração no espaço livre varia de acordo com o tipo de crescimento, o peso do tecido, o volume do frasco, a maneira em que este é selado e as condições de cultivo *in vitro* (GEORGE, 1993). O etileno que acumula nos frascos pode regular o crescimento das plantas. Desta maneira, a utilização de inibidores e precursores da biossíntese de etileno pode facilitar estudos da ação do etileno, assim como melhorar a resposta morfogênica dos explantes.

No presente trabalho, a adição de inibidores (AVG e STS) e do precursor (ACC) da biossíntese de etileno no meio de indução de embriogênese somática não afetou a aquisição de competência embriogênica, pois observa-se que em todos os tratamentos houve formação de embriões somáticos. Assim como foi relatado por KOEHLER (2004), que observou em embriões imaturos de *Carica papaya* L., cultivados em presença de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, não apresentaram diferenças significativas com a inclusão no meio de 3, 10 e 30 µM de ACC em relação ao controle.

Para a característica peso da matéria fresca, não houve uma modificação na resposta do explante com o aumento da concentração de ACC, enquanto que com o aumento da concentração do AVG houve uma redução. O que contrasta com os resultados obtidos por ADKINS *et al.* (1993), no qual, 5 mmol m⁻³ de AVG e 50 mmol m⁻³ de AgNO₃ aumentaram o crescimento do calo de *Oryza sativa* L., enquanto que 200 mmol m⁻³ de ACC decresceu o crescimento significativamente.

Em *Carica papaya*, a utilização de doses crescentes de inibidores da biossíntese, AVG e STS, observou-se redução na formação de calos embriogênicos e no número de embriões somáticos (KOEHLER, 2004). Resultado semelhante foi

encontrado no presente trabalho, onde se verificou que a adição de 3, 10 e 30 μM de ACC ao meio de indução aumentou a frequência de embriões e de primórdios radiculares. A adição de AVG levou a um aumento no número de primórdios radiculares com o aumento da concentração. Porém, a frequência de embriões elevou com a adição de 3 μM de AVG, e reduziu com o aumento da concentração. E a presença de STS reduziu apenas em parte a frequência de embriões e o peso da matéria fresca. Por outro lado, a adição de 3 e 10 μM de STS aumentou a frequência de primórdios radiculares e reduziu drasticamente com a adição de 30 μM .

CHANDRA *et al.* (1997) observaram resultados contrastantes, onde o etileno estimulou a diferenciação de brotos em cotilédones de *Cicer arietinum* L, mas em hipocótilos, o aumento de etileno inibiu o crescimento e diferenciação. Considerando-se que hipocótilo é o explante utilizado no presente trabalho para a organogênese, os resultados estão de acordo com o obtido por estes autores.

Em *Prunus persica* x *P. amugdalus*, o etileno a 0,1 ppm, aplicado durante as primeiras duas semanas de cultura, aumentou o número e o comprimento dos brotos produzidos *in vitro* (DIMASI-THERIOU e ECONOMOU, 1995). HUXTER *et al.* (1979) sugeriram que há uma correlação positiva entre a taxa de produção de etileno e crescimento, o que corrobora os dados apresentados no presente estudo.

A suplementação do meio com AVG levou a uma redução no tamanho do calo, no alongamento dos brotos e levou a uma coloração amarelada dos brotos, sendo que com 30 μM de AVG não foi observada resposta. BIONDI *et al.* (1998) obtiveram resultados semelhantes, no qual 0,5 μM de AVG inibiu a produção de etileno provocou um grande aumento na formação de meristemóides na cultura e o aparecimento de brotos. Semelhante também ao observado por KOEHLER (2004), que sugere que níveis maiores que 3 μM de AVG foram, possivelmente, tóxicos aos tecidos de *Carica papaya*.

O Retain[®] é um composto solúvel em água e apresenta como ingrediente ativo o AVG, sendo que este participa da sua composição em 15% e os outros 85% são descritos como ingredientes inativos (Registro químico nacional, 2001). O Retain[®] quando aplicado em frutos de *Prunus salicina* reduz a produção de etileno (McGLASSON *et al.*, 2005), assim como em plantações de *Malus*

domestica (AMARANTE *et al.*, 2002; GRUBE e HAMILTON, 2005; JOHNSON e COLGAN, 2003).

Estudos da sua resposta *in vitro* não foram realizados anteriormente. No presente trabalho, quando se compara os resultados obtidos com o Retain[®] e com AVG, observa-se que com o aumento da concentração de ambos houve uma queda no peso da matéria fresca e na frequência de embriões, porém quando utilizado o Retain[®], observa-se que esta diminuição é mais acentuada, com diferença estatisticamente significativa. Em relação à frequência de primórdios radiculares observa-se uma resposta semelhante.

Desta maneira, sugere-se a utilização de Retain[®] *in vitro*, pois observou-se uma tendência semelhante em ambos os tratamentos, AVG e Retain[®]. Porém novos estudos são necessários a fim de se averiguar se estes ingredientes inertes afetam a resposta *in vitro* em outras espécies.

Desse modo, conclui-se que o etileno modifica a resposta morfogênica obtida nos diferentes explantes e meios indutores, sendo essa alteração na resposta possível de acompanhar com a utilização de precursor ou de inibidores de etileno. Assim como estes compostos são adequados para a utilização em protocolos de cultivo *in vitro*.

Apesar de algumas exceções e pequenas diferenças, pode-se prever um padrão na resposta morfogênica quando adicionado o precursor ou quando se acrescenta um inibidor.

A resposta em meio suplementado com Retain[®] foi, em geral, menor do que a obtida quando utilizou-se AVG, o que sugere uma ação inibitória dos compostos inertes presente na formulação comercial. Porém, o baixo custo do Retain[®], relativamente ao se comparar ao produto com pureza analítica, é um estímulo para a utilização deste na morfogênese *in vitro*. Para tal, sugere-se mais estudos, pois os compostos inertes podem apresentar um efeito negativo ou um efeito positivo, como pode ser o caso da indução de embriogênese direta em berinjela.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADKINS, S.W., R. KUNANUVATCHAIDACH, S.J. GRAY, A.L. ADKINS. 1993. Effect of ethylene and culture environment on rice callus proliferation. *J. Exp. Bot.* 44:1829-1835.
- AMARANTE, C.V.T., A. SIMIONI, C.A. MEGGUER, L.E.B. BLUM. 2002. Effect of aminoethoxyvinilglycine (AVG) on preharvest fruit drop and maturity of apples. *Rev. Bras. Frutic.* 24:661-664.
- BIONDI, S., S. SCARAMAGLI, F. CAPITANI, G. MARINO, M.M. ALTAMURA, P. TORRIGIANI. 1998. Ethylene involvement in vegetative bud formation in tobacco thin layers. *Protoplasma* 202:134-144.
- CHANDRA, R., S. KHETARPAL, R. POLISETTY. 1997. Effect of plant growth regulators on evolution of ethylene and methane by different explants of chickpea. *Biol. Plant.* 40:337-343.
- CHI, G.L., E.C. PUA, C.J. GOH. 1991. Role of ethylene in *de novo* shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson *in vitro*. *Plant Physiol.* 96:178-183.
- CRUZ, C.D. 2001. Programa GENES. Editora UFV. Release Versão Windows. Editora UFV, Viçosa.
- DIMASI-THERIOU, K., A.S. ECONOMOU. 1995. Ethylene enhances shoot formation in cultures of the peach rootstock GF-677 (*Prunus persicae* x *P. amygdalus*). *Plant Cell Rep.* 15:87-90.
- GAMBORG, O.L., R.A. MILLER, K. OJIMA. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151 - 158.
- GEORGE, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. 2 ed. Exegetics Limited, Edington, England.
- GRUBE, B., G. HAMILTON. 2005. New Hampshire vegetable, berry & tree fruit newsletter. University of New Hampshire Cooperative Extension.

HUXTER, T.J., D.M. REID, T.A. THORPE. 1979. Ethylene production by tobacco (*Nicotiana tabacum*) callus. *Physiol. Plant.* 46:374-380.

INGEMARSSON, B.S.M., M. BOLLMARK. 1997. Ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid turnover in *Picea abies* hypocotyls after wounding. *J. Plant Physiol.* 151:711-715.

JOHNSON, D.S., R.J. COLGAN. 2003. Low ethylene controlled atmosphere induces adverse effects on the quality of 'Cox's Orange Pippin' apples treated with aminoethoxyvinylglycine during fruit development. *Posth. Biol. Technol.* 27:59-68.

KOEHLER, A.D. 2004. Embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya* L.): anatomia, histoquímica e influência de ACC, AVG e STS e de pulsos de 2,4-D. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MATTHIJS, D., J. GIELIS, L. DEBERGH. 1995. Ethylene, p. 473-491, *In* J. AITKEN-CHRISTIE, et al., eds. *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

McGLASSON, W.B., A.C. RATH, L. LEGENDRE. 2005. Preharvest application of aminoethoxyvinylglycine (AVG) modifies harvest maturity and cool storage life of 'Artic Snow' nectarines. *Posth. Biol. Technol.* 36:93-102.

MURASHIGE, T., F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals. 2001. Evaluation of the new active AMINOETHOXYVINYLGLYCINE (AVG) in the product RETAIN PLANT GROWTH REGULATOR. 43p.

PAIVA-NETO, V.B. 2002. Morfogênese *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PARK, K.Y., S.H. LEE. 1994. Effects of ethylene and auxin on polyamine levels in suspension-cultured tobacco cells. *Physiol. Plant.* 90:382-390.

PICOLI, E.A.T. 2000. Morfogênese *in vitro* e transformação genética de berinjela (*Solanum melongena* L. cv. Embu) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

REID, M.S., J.L. PAUL, M.B. FARHOOMAND, A.M. KOFRANEK, G.L. STABY. 1980. Pulse treatments with the silver thiosulfate complex extend the vase life of cut carnations. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105:25-27.

REIS, L.B., V.B. PAIVA-NETO, E.A.T. PICOLI, M.G.C. COSTA, M.M. RÊGO, C.R. CARVALHO, F.L. FINGER, W.C. OTONI. 2003. Axillary bud

development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. In *Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 39:618-622.

TAIZ, L., and E. ZEIGER. 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3 ed. ed. Artmed, Porto Alegre, RS.

Capítulo IV

Influência do tipo de vedação na morfogênese *in vitro* de berinjela (*Solanum melongena* L.)

RESUMO

Avaliou-se a influência do tipo de vedação nas características morfológicas de berinjela na indução de embriogênese somática, organogênese, assim como, das características anatômicas e morfológicas no crescimento de ápices caulinares. Para tal, sementes do cultivar Embu foram desinfestadas e inoculadas em meio MS acrescido de vitaminas B₅, 100 mg L⁻¹ de inositol e 2% de sacarose, solidificado com 6,5 gL⁻¹ de ágar Merck[®]. Para indução de embriogênese, cotilédones seccionados longitudinalmente foram inoculados em meio MS, nas condições citadas acima, acrescido de 10 mg L⁻¹ de NAA; para indução de organogênese, segmentos de hipocótilos (~ 1 cm) foram cultivados em meio MS contendo 0,1 mg L⁻¹ de AIA. As placas foram vedadas com Micropore[®] 3M (fita hipoalergênica), Parafilm M (Sigma[®]) e filme plástico transparente de policloreto de vinila - PVC (Goodyear[®]). Para verificar o efeito da vedação no crescimento de ápices caulinares, estes foram inoculados em meio MS contendo a metade da concentração dos sais e vedados com PVC, tampa de polipropileno autoclavável (TSF) e a mesma tampa contendo dois filtros MilliSeal[®] air vent de 0,22 µm (TCF). Além disso, cortes histológicos e diafanização das folhas foram realizados. Na embriogênese, observou-se que para o peso da matéria fresca, as vedações do tipo PVC e Parafilm[®] foram estatisticamente superiores ao Micropore[®]. Para todas as características avaliadas nos explantes mantidos em meio MS, acrescido de 0,1 mg L⁻¹ de AIA, não se observou diferença estatística. Todavia, para ápices caulinares detectou-se diferença estatística para as características morfológicas analisadas, à exceção de altura de plântula. As plântulas mantidas nos frascos vedados com TCF foram mais vigorosas e superiores em relação as características anatômicas estudadas. Observou-se que um maior número de trocas gasosas está correlacionado com o grau de diferenciação dos tecidos. A partir da análise de preparações de folhas diafanizadas, determinou-se que o número de estômatos e de células epidérmicas foi maior na face abaxial em todos os tratamentos.

Palavras chave: embriogênese somática, organogênese, alongamento, anatomia foliar e vedação.

INTRODUÇÃO

Os explantes *in vitro* são mantidos em frascos pequenos e vedados, e em geral, apresentam elevada umidade relativa, temperatura constante, baixa densidade de fótons ativos, grande flutuação na concentração de CO₂, alta concentração de açúcar, de sais e de reguladores de crescimento no meio e, sobretudo, ausência de microrganismos (AITKEN-CRISTIE *et al.*, 1995).

Dependendo do tipo de vedação encontra-se, também, uma baixa troca de ar entre o ambiente externo e interno (CHEN, 2004), levando ao acúmulo de compostos gasosos nos frascos. As modificações da concentração destes gases afetam o crescimento e a morfogênese de muitas espécies de plantas em vários sistemas de cultivo *in vitro* (MARINO e BERARDI, 2004). Além disso, o meio nos frascos tem uma concentração adequada de água e nutrientes de tal maneira que a umidade relativa interna é muito alta (CHEN, 2004).

Essas condições proporcionam baixa taxa de transpiração e fotossíntese, dificuldade de absorção de água e nutrientes, elevada taxa de respiração no período escuro e, conseqüentemente, baixa taxa de crescimento dos explantes (KOZAI *et al.*, 1997a).

A taxa de absorção de água e alguns tipos de minerais (tais como cálcio) se elevam com o aumento da taxa de transpiração. Assim, uma pequena diferença na umidade relativa causa mudança significativa na taxa de absorção de água e de alguns íons (JEONG *et al.*, 1995; NGUYEN e KOZAI, 1998).

A elevada umidade relativa do ambiente interno dos frascos pode influenciar características anatômicas (SCIUTI e MORINI, 1995), fisiológicas e morfológicas (KOZAI *et al.*, 1997b), resultando em alta mortalidade de plântulas após a transferência para as condições *ex vitro* (NGUYEN e KOZAI, 1998). Dentre as características importantes em condições de alta umidade relativa,

CHEN (2004) observou um desenvolvimento precário da camada de cera epicuticular e os estômatos não apresentaram funcionamento normal.

O desenvolvimento de cera epicuticular é uma vantagem para plântulas durante o período de aclimação, pois protege de dessecação. A reduzida quantidade de cera epicuticular está diretamente correlacionada com a perda excessiva de água das plântulas após o transplante (ZOBAYED *et al.*, 2001a; CHEN, 2004). Acredita-se que a baixa capacidade de absorção de água e o sistema radicular rudimentar das plântulas mantidas em condições de baixa troca gasosa sejam parcialmente responsáveis pela severa perda de água das folhas durante a aclimação (ZOBAYED *et al.*, 2001a).

Pode-se reduzir a umidade relativa utilizando-se de filtros permeáveis a gases, como o poliuretano e polipropileno (ZOBAYED, 2000), e ventilação forçada (ZOBAYED *et al.*, 2001a). Dessa maneira, aumenta-se o número de trocas gasosas e a atmosfera interna dos frascos de cultura fica menos contrastante daquela encontrada no ambiente externo (GONÇALVES, 2004).

Com o aumento das trocas gasosas, observa-se que o crescimento e taxa de fotossíntese das plântulas *in vitro* aumentam (NGUYEN *et al.*, 1999), os estômatos apresentam funcionamento normal (ZOBAYED *et al.*, 2001a), assim como o desenvolvimento da cutícula (JEONG *et al.*, 1995). Logo, há um favorecimento do processo fotossintético das plantas *in vitro*, muitas vezes, facilitando o processo de aclimação (NGUYEN *et al.*, 1999; ZOBAYED, 2000).

No cultivo *in vitro* de *Herreria salsaparilha*, a vedação com tampa com filtro facilitou a perda de água do sistema e permitiu que a concentração de oxigênio no interior dos frascos fosse semelhante à encontrada no ambiente externo. Utilizando-se esse tipo de vedação, as condições de cultivo se mantiveram mais próximas às condições do ambiente externo, se comparadas a outros tratamentos (GONÇALVES, 2004).

LAI *et al.* (1998) demonstraram que o controle de gases na atmosfera interna dos frascos, através de sistemas de ventilação, pode resultar em melhor rendimento e qualidade dos brotos de *Carica papaya*. Esses sistemas consistem na utilização de tampas com membranas facilitadoras de trocas gasosas, impedindo o acúmulo de gases, entre estes o etileno.

Em jojoba, a comparação entre propágulos crescidos em condições de ventilação restrita e os propágulos ventilados, mostrou que os últimos tornam-se menos propensos a hiperhidricidade, mais lignificados e mais resistentes à perda de água para o ambiente. Em adição, nos propágulos ventilados, os autores observaram que a deposição de parede celular na superfície da folha foi maior, o sistema vascular mais desenvolvido com incrementos na área foliar e massa seca (MILLS *et al.*, 2004).

Sob um grande número de trocas gasosas, observou-se o aumento na massa fresca, no comprimento dos brotos e da raiz e na área foliar das plântulas *ex vitro* de café cultivadas fotoautotroficamente no substrato Florialite[®], resultado que indica que o micro-ambiente dos frascos, incluindo atmosfera e rizosfera, tem funções decisivas no crescimento das plântulas. Essas condições de cultivo podem aumentar a absorção de água e minerais pelo transporte acrópeto dos elementos do meio, assim como o aumento de transpiração (NGUYEN *et al.*, 1999).

Estudos têm revelado que fatores ambientais afetam consideravelmente o crescimento e desenvolvimento das plântulas *in vitro*. Os mesmos sugerem que o controle do ambiente pode vir a se tornar uma técnica essencial para obter plântulas de boa qualidade nas datas desejadas com baixos custos de produção (NGUYEN e KOZAI, 1998; ZOBAYED *et al.*, 2004).

Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do tipo de vedação nas características morfológicas de *Solanum melongena* L. na indução de embriogênese somática, organogênese, assim como, das características anatômicas e morfológicas no alongamento de *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do material vegetal e germinação *in vitro*

As sementes de berinjela (*Solanum melongena* L.) cultivar Embu Horticides[®] utilizadas nos experimentos foram obtidas no comércio local de Viçosa, MG.

As sementes foram embebidas por 72 horas em água deionizada e estéril, submetidas a desinfestação a cada 24 horas, aproximadamente, ao longo deste período. Neste processo, foram imersas em álcool 70% por 1 minuto, seguido por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 2,5 % acrescido de 2 gotas de Tween 20 para cada 100 mL de solução e enxaguadas em água deionizada e estéril três vezes seguidas.

Em seguida, as sementes foram inoculadas em meio composto de sais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), vitaminas B₅ (GAMBORG *et al.*, 1968), 100 mg L⁻¹ de inositol e 2% de sacarose, solidificado com 6,5 g L⁻¹ de ágar (Merck[®]), com o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C e a 1 atm, durante 20 minutos. Foram distribuídos 40 ml de meio em cada frasco de vidro (12 cm de altura e 6cm de largura) e cerca de 10 sementes foram inoculadas por recipiente.

As culturas foram mantidas sob irradiância de $37 \pm 4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil), fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.2. Indução de embriogênese somática e organogênese

Utilizou-se para a indução de embriogênese somática ou organogênese, oito a dez cotilédones ou hipocótilos provenientes de plântulas com aproximadamente 15 dias como fonte de explantes, respectivamente. Os cotilédones foram seccionados longitudinalmente e inoculados em meio de cultivo com a face abaxial voltada para o meio de cultivo. Segmentos de hipocótilo com cerca de 1 cm de comprimento foram inoculados em meio de cultivo seguindo a orientação base-ápice.

O meio composto de sais MS, vitaminas B₅, 100 mg L⁻¹ de inositol, 3% de sacarose, 6,5 g L⁻¹ de ágar foi utilizado. Acrescentou-se como regulador de crescimento 10 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftaleno acético) ou 0,1 mg L⁻¹ de AIA (ácido indolil-3-acético) nos meios para indução de embriogênese ou organogênese, respectivamente, sendo que, o NAA foi adicionado antes da autoclavagem e o IAA, após. O pH foi ajustado para 5,8, o meio vertido em placas de Petri estéreis (9 cm de diâmetro e 1,2 cm de altura). As placas foram mantidas sob as condições de cultivo citadas no item 2.1.

Após 30 dias, foram avaliados o peso da matéria fresca, a consistência, a cor e a intensidade do calejamento, o número de embriões totais, o número de primórdios radiculares e a presença de necrose e de hiperhidricidade sob condições de indução de embriogênese somática. Para condições de indução de organogênese, foram observados aos 30 dias: o peso da matéria fresca, a coloração, a intensidade e a consistência do calejamento, o número de ramos, de gemas e de raízes e se estes estavam hiperhídricos.

2.2.1. Tipos de vedação na morfogênese e multiplicação

Para avaliar o efeito da vedação na organogênese e embriogênese somática, cotilédones ou hipocótilos foram inoculados em meio de indução como descrito no item 2.2, sendo as placas vedadas com fita hipoalergênica

(Micropore[®] 3M), Parafilm M (Sigma[®]) e filme plástico transparente do tipo policloreto de vinila - PVC (Goodyear[®]).

Ápices de plântulas germinadas *in vitro* foram utilizados para avaliar a influência da vedação na multiplicação destas plântulas. Para tal, em cada tratamento, dez ápices com aproximadamente 2 cm apresentando duas folhas (que foram retiradas durante o processo) foram colocados em meio MS contendo a metade da concentração de sais em dez frascos de vidro (12 cm de altura e 6 cm de largura) e vedados com PVC, tampa de polipropileno autoclavável (56 mm de diâmetro interno, 3 mm de espessura e 12 mm de altura) ou a mesma tampa contendo dois filtros de 0,22 µm de poro (MilliSeal[®], Japão).

Após 30 dias, as plântulas foram retiradas do frasco e as características peso fresco e seco, altura da plântula, diâmetro do caule e da folha, o comprimento da raiz e da folha, foram determinadas. Além disso, cortes histológicos foram realizados. Para tal, a terceira folha expandida e não senescente contada a partir do ápice caulinar foi retirada em cinco indivíduos diferentes para cada um dos tratamentos. De cada folha foram extraídos pedaços de 0,6 cm² da região mediana.

O material vegetal foi fixado em FAA₅₀ por 24 horas, após o qual foi transferido para álcool etílico 50% (JOHANSEN, 1940); após a fixação, o material foi desidratado em série alcoólica até 95%, embebido e incluído em metacrilato (HistoresinTM, Leica). Os blocos foram cortados em micrótomo rotativo de avanço automático (Leica RM 2155-UK), com cortes de 5 µm de espessura, corados em Azul de Toluidina por 11 minutos e montadas lâminas e lamínulas com Permount.

Foram realizadas 1000 medições da espessura da folha, da epiderme superior e inferior, do parênquima paliçádico e lacunoso, oriundos da observação de uma amostra composta de, em média, 207 cortes e 4,9 campos por corte, para cada tratamento. Adicionalmente, foram calculados a proporção do parênquima paliçádico e lacunoso em relação à espessura total da folha.

Para avaliação da epiderme foliar, foi realizada diafanização em cloral hidratado, seguido de 4 lavagens em água destilada, no qual, o material vegetal permaneceu por 6 horas. O material foi corado com Safrablau e novamente

lavado. Após, as folhas foram desidratadas em uma séria alcoólica, álcool-xilol 3:1, 1:1 e 1:3, seguido por xilol por 2 vezes. As lâminas foram montadas com Permunt. Foi avaliado o número de estômatos, de células epidérmicas, área das células-guarda e índice estomático (IE).

O índice estomático foi obtido pela equação: $IE = \frac{NE}{NE + NCE} \cdot 100$;

onde NE representa o número de estômatos e NCE o número das demais células epidérmicas.

2.3. Delineamento experimental

Os experimentos foram repetidos e seguiram o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para a comparação entre as médias dos tratamentos foi realizado o teste de Tukey a 5% de significância para todos os experimentos. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa GENES versão Windows/2004.2.1, desenvolvido por CRUZ (2001).

RESULTADOS

Considerando-se a indução de embriogênese, observou-se que o tipo de vedação influenciou no peso da matéria fresca (Tabela 1), sendo que as vedações do tipo PVC e Parafilm[®] foram estatisticamente superiores ao Micropore[®] (Figura 1). As placas vedadas com Micropore^{MR} apresentaram uma frequência de embriões somáticos menor, assim como, o peso da matéria fresca.

Tabela 1. Resumo da análise de variância das características observadas no meio de indução de embriogênese somática em *Solanum melongena* L. ‘Embu’.

Fontes de Variação	GL	QM		
		PMF	NE	NPR
Tipos de Vedação	2	0,3142*	271,0421	5,5783
Resíduo	24	0,0317	426,27308	30,6868
Média Geral		0,5884	35,9463	7,0370
Coefficiente de Variação (%)		30,25	57,44	78,72

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. PMF – peso da matéria fresca; NE – número de embriões; NPR – número de primórdios radiculares.

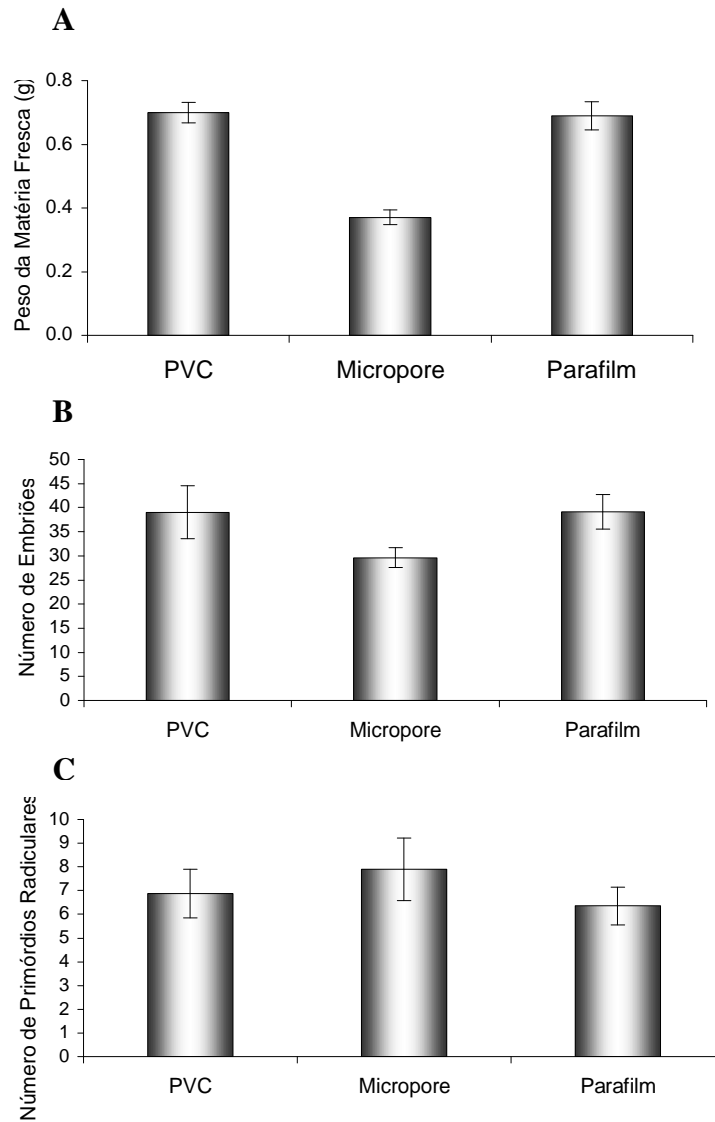


Figura 1. Influência do tipo de vedação sobre a indução de embriogênese somática em *Solanum melongena* L. 'Embu'. A – Peso da matéria fresca; B – Frequência de embriões somáticos; C – Frequência de primórdios radiculares. As barras verticais indicam os erros padrões da média.

Para as características observadas nos explantes mantidos no meio indutor de organogênese não houve diferença estatística (dados não mostrados). Porém, observou-se, principalmente no primeiro experimento, um maior calejamento nas placas vedadas com PVC. Enquanto que os ramos formados nas placas vedadas com Micropore[®] são maiores, mais esverdeados e mais vigorosos (Figura 2). O peso observado está em maior parte relacionado ao calejamento, assim os explantes mantidos em placas vedadas com Parafilm[®] apresentaram maior calejamento. Um problema identificado foi que algumas placas apresentaram rachaduras no Parafilm[®], certamente modificando os resultados, uma vez que facilitam trocas gasosas.

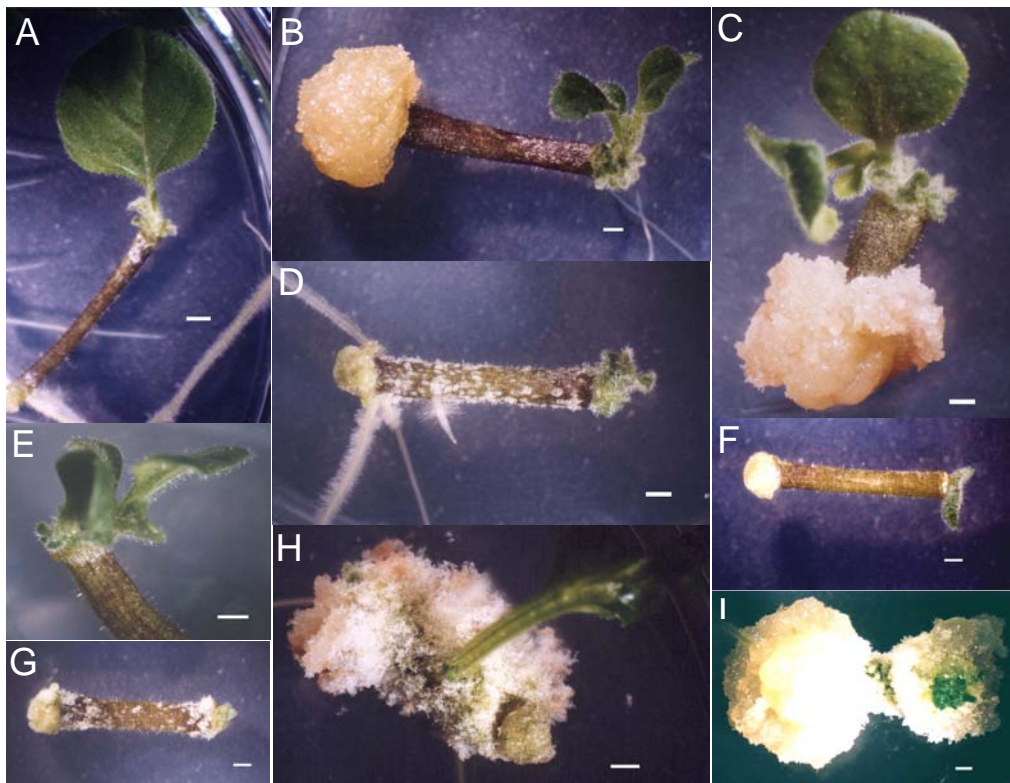


Figura 2. Influência do tipo de vedação sobre a indução de organogênese em *Solanum melongena* L. 'Embu'. Explantes mantidos em placas vedadas com: A, B e C – Milipore^{MR}; D, E e F – Parafilm[®]; G, H e I – PVC. Barra = 1 mm.

O ápice caulinar foi utilizado para multiplicação e manutenção das plântulas *in vitro*. Visando melhorar as condições do microambiente *in vitro*, avaliou-se o tipo de vedação. Para tal, utilizou-se de tampas de polipropileno (TSF), a mesma tampa contendo dois filtros de MilliSeal[®] (TCF) ou policloreto de vinila (PVC). Detectou-se diferença estatística para as características morfológicas analisadas, exceto para altura de plântula (ALT) (Tabela 2). Observou-se que as plântulas mantidas nos frascos vedados com TCF eram maiores e mais vigorosas por apresentarem folhas e raízes mais desenvolvidas que o controle (Figura 4). Apesar de não apresentar diferença estatística no comprimento da raiz (Figura 3G) estas apresentavam-se mais ramificadas e bem desenvolvidas (Figura 4E). Os pesos da matéria fresca e seca foram maiores no tratamento TCF (Figura 3A e 3H), assim como o diâmetro do caule (Figura 3D).

Em geral, para as características avaliadas não houve diferença entre os tratamentos PVC e TSF, exceto para a característica comprimento da folha, no qual, o PVC foi estatisticamente inferior aos demais (Figuras 3 e 4).

Tabela 2. Resumo da análise de variância das características morfológicas demonstrando a influência do tipo de vedação na obtenção de plântulas durante o alongamento de *Solanum melongena* L. ‘Embu’, a partir do ápice caulinar após 30 dias.

F. V.	GL	QM							
		PMF	ALT	DC	LF	CF	NF	CR	PMS
Tratamentos	2	2,45*	1,45	0,67*	4,19*	6,47*	0,69*	22,32	0,03*
Resíduo	18	0,21	0,90	0,09	0,19	0,20	1,17	9,36	0,001
Média geral		0,76	2,93	1,79	2,31	2,59	3,65	13,90	6,06
C.V.		59,33	32,33	16,61	19,01	17,27	29,67	22,02	60,27

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. PMF – peso da matéria fresca; ALT – altura da plântula; DC – diâmetro do caule; LF – largura da folha; CF – comprimento da folha; NF – número de folhas; CR – comprimento da raiz; PMS – peso da matéria seca.

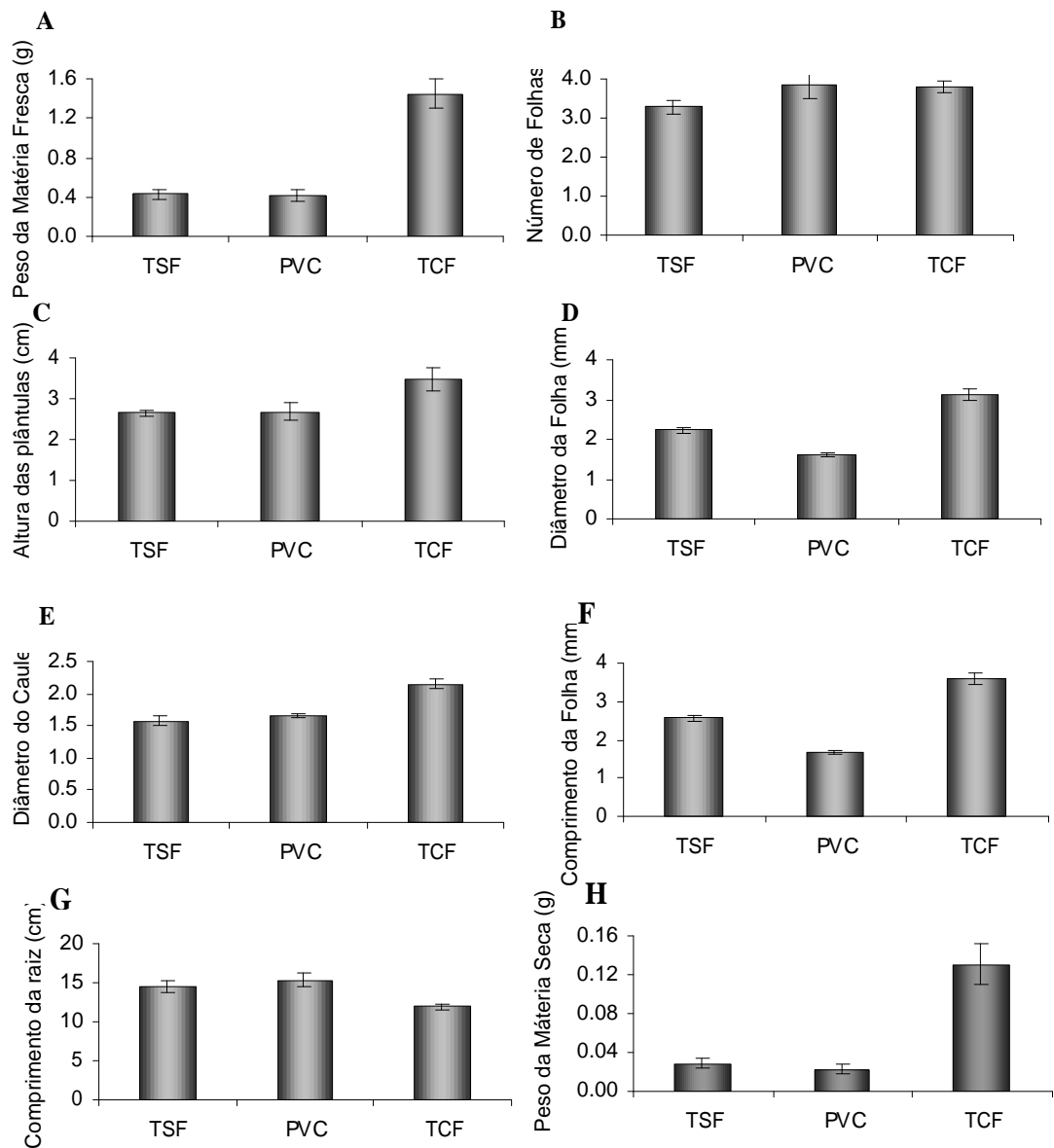


Figura 3. Influência do tipo de vedação nas características morfológicas de plântulas de *Solanum melongena* L. ‘Embu’, com 30 dias, alongadas a partir do ápice caulinar. As barras verticais indicam os erros padrões da média.

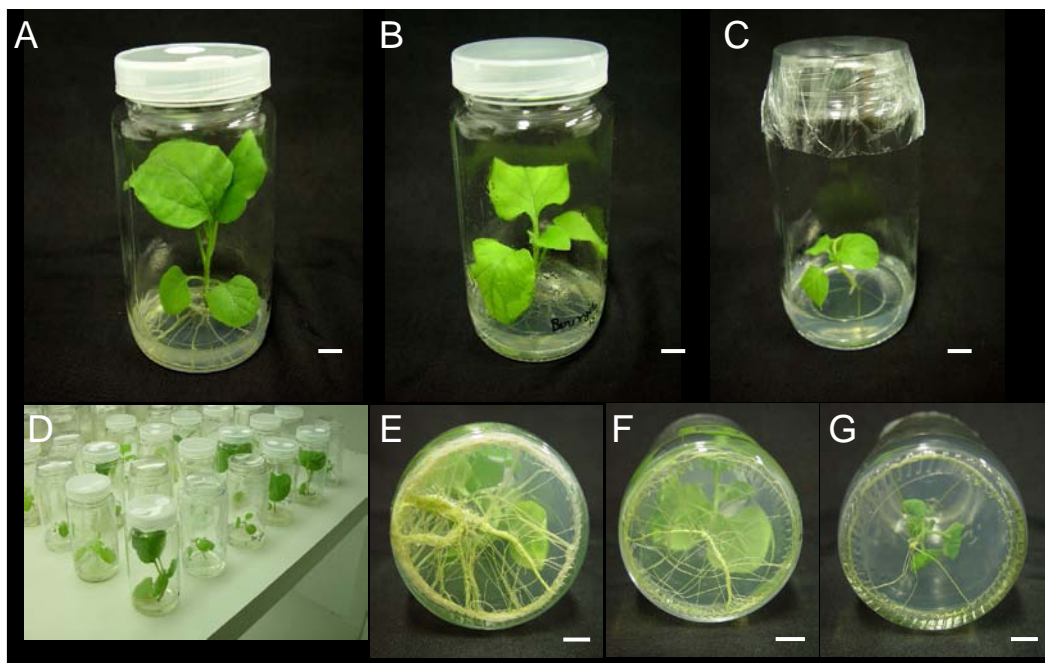


Figura 4. Aspecto das plântulas de *Solanum melongena* L. ‘Embú’ cultivadas sob diferentes vedações. A – frasco vedado com tampa de prolipropileno com filtro MilliSeal® (TCF); B – frasco vedado com tampa de prolipropileno sem filtro (TSE); e C – frasco vedado com filme plástico transparente de policloreto de vinila (PVC). D – detalhe de alguns frascos de cultura do experimento de vedação. E, F e G – detalhes do desenvolvimento do sistema radicular, nos diferentes tipos de vedação: E – TCF; F – TSE; e G – PVC. Barra = 1 cm.

Cortes histológicos das folhas de berinjela foram realizados para todos os tratamentos (Figura 6). A partir dos mesmos foi conduzida a morfometria objetivando evidenciar a variação das epidermes e mesofilo.

Com relação a essas características anatômicas, observa-se que todos os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas (Tabela 3). Os coeficientes de variação de todas as características avaliadas variaram entre 12 a 26 %, relacionado à grande variação na altura dos parênquimas e à irregularidade observada no tamanho das células epidérmicas (Tabela 3 e Figura 6).

Para a característica altura total do limbo foliar, a vedação com PVC foi estatisticamente superior, enquanto TCF foi inferior (Figura 5A). As diferenças de espessura da lâmina foliar dentro e entre os tratamentos foram devidas à variação no diâmetro e forma das células epidérmicas, assim como a diferenciação das células do mesofilo (parênquima clorofiliano) e tecidos vasculares.

Tabela 3. Resumo da análise de variância das características anatômicas demonstrando a influência do tipo de vedação na obtenção de plântulas durante a multiplicação de *Solanum melongena* a partir do ápice caulinar após 30 dias.

F. V.	GL	QM						
		EF	EPS	PP	PL	EI	PPP	PPL
Tratamentos	2	16539*	6359,9*	14730*	43437*	1728,9*	0,70*	0,63*
Resíduo	2997	628,2	42,31	94,35	398,85	24,64	0,002	0,004
Média geral		193,86	24,77	59,52	91,08	18,49	0,31	0,47
C. V.		12,93	26,26	16,32	21,93	26,84	15,07	13,07

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. EF – altura total do limbo foliar; EPS – altura da epiderme superior; PP – altura do parênquima paliçádico; PL – altura do parênquima lacunoso; EI – altura da epiderme inferior; PPP – proporção de parênquima paliçádico; e PPL - proporção de parênquima lacunoso.

Além disso, as paredes periclinais externas das células epidérmicas apresentaram forma convexa e ligeiramente irregulares (Figuras 6A a F e I a J). Esta irregularidade foi mais evidente em frascos vedados com TCF (Figuras 6C, D, I e J), provavelmente devido à menor deposição de parede celular e de cutícula, que resultou numa estrutura mais delgada e mais facilmente alterada.

Os diferentes tamanhos de células epidérmicas observados podem ser atribuídos a uma característica da própria espécie, aos diferentes tipos celulares (células epidérmicas propriamente ditas, base de tricomas, células guarda e subsidiárias), à forma irregular das células resultando em cortes de diferentes diâmetros, além do efeito da cultura *in vitro* e dos próprios tratamentos (Figura 6). Para altura da epiderme, o tratamento TSF foi maior em ambas, epiderme superior e inferior, enquanto que em TCF foram observados os menores valores (Figura 5B).

O mesofilo apresentou-se diferenciado em parênquima paliçádico e lacunoso, entretanto houve variação no grau de diferenciação dos tecidos, com as células apresentando-se mais diferenciadas no tratamento de TCF, seguido por PVC e, enfim, TSF. A distinção das células do parênquima clorofiliano paliçádico foi dificultada devido a pouca diferenciação das células em alguns cortes neste último tratamento (Figura 6D). A característica altura do parênquima paliçádico foi maior no TSF, entretanto para a característica a altura do parênquima lacunoso

o PVC foi estatisticamente superior, enquanto TSF foi o tratamento inferior (Figura 5C).

A organização bicolateral dos tecidos vasculares manteve-se constante em todos tratamentos de acordo com a avaliação qualitativa dos tecidos vasculares. Apesar de aparentemente haver diferenças quanto à diferenciação do tecido vascular, no qual, podemos observar uma espessura de limbo ligeiramente menor quando utiliza-se o TCF aliada a um mesofilo mais diferenciado (Figuras 6G e H), não foi realizada quantificação desta característica.

As proporções de parênquima paliçádico e lacunoso por folha seguiram o mesmo padrão observado para altura dos parênquimas (Figura 5C e D), além disso, esta característica sugere uma maior diferenciação dos tecidos no tratamento TCF (Figura 6). Ressalta-se que este tratamento apresentou as menores médias de altura das epidermes e do parênquima lacunoso enquanto a média do parênquima paliçádico foi maior.

A partir da diafanização, encontrou-se significância estatística em relação à face da folha para as características analisadas, exceto para ACG. Assim como, obteve-se uma interação significativa entre face da folha e tipo de vedação. Dessa maneira, observa-se que as características número de estômatos (NE), número de células-guarda (NCE), área das células-guarda (ACG) e índice estomático (IE) variaram dependendo do tipo de vedação utilizada (Tabela 4).

O número de estômatos (NE) foi maior na face abaxial em todos os tratamentos. Ainda, com relação à face abaxial, todos os tratamentos diferiram significativamente, sendo o PVC, seguido por TCF e, finalmente, do TSF. Para a face adaxial, o melhor tratamento também foi PVC e não houve diferença entre os outros dois tratamentos (Figura 7A).

O número de células epidérmicas (NCE) também foi maior na face abaxial. Além disso, verificou-se que o PVC e o TCF foram os melhores tratamentos quando analisada a face abaxial, contudo, na face adaxial, apenas o PVC se destacou (Figura 7B).

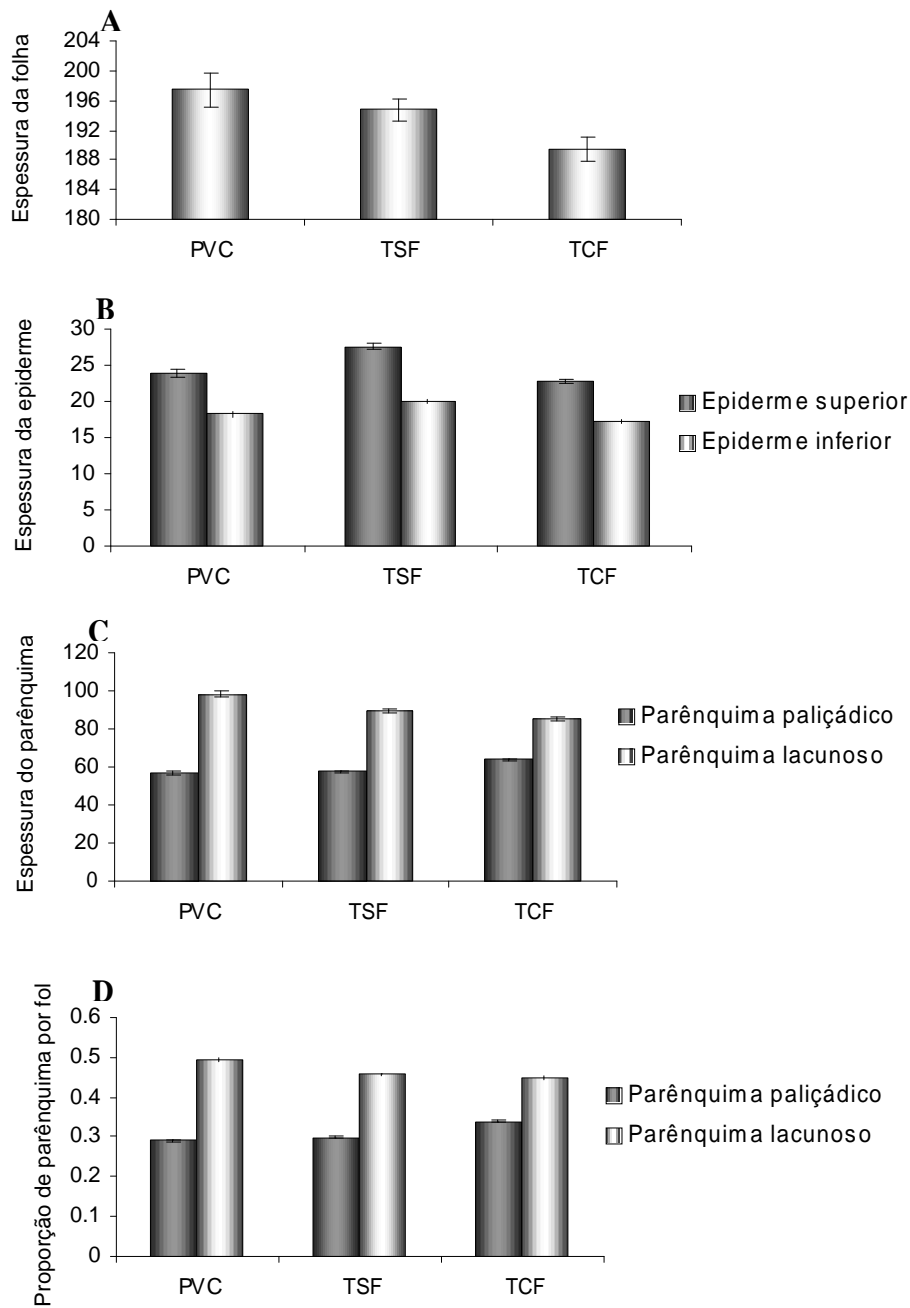


Figura 5. Influência do tipo de vedação durante o alongamento de *Solanum melongena* L. 'Embu', a partir de ápice caulinar após 30 dias de cultivo medidas em µm. As barras verticais indicam os erros padrões da média.

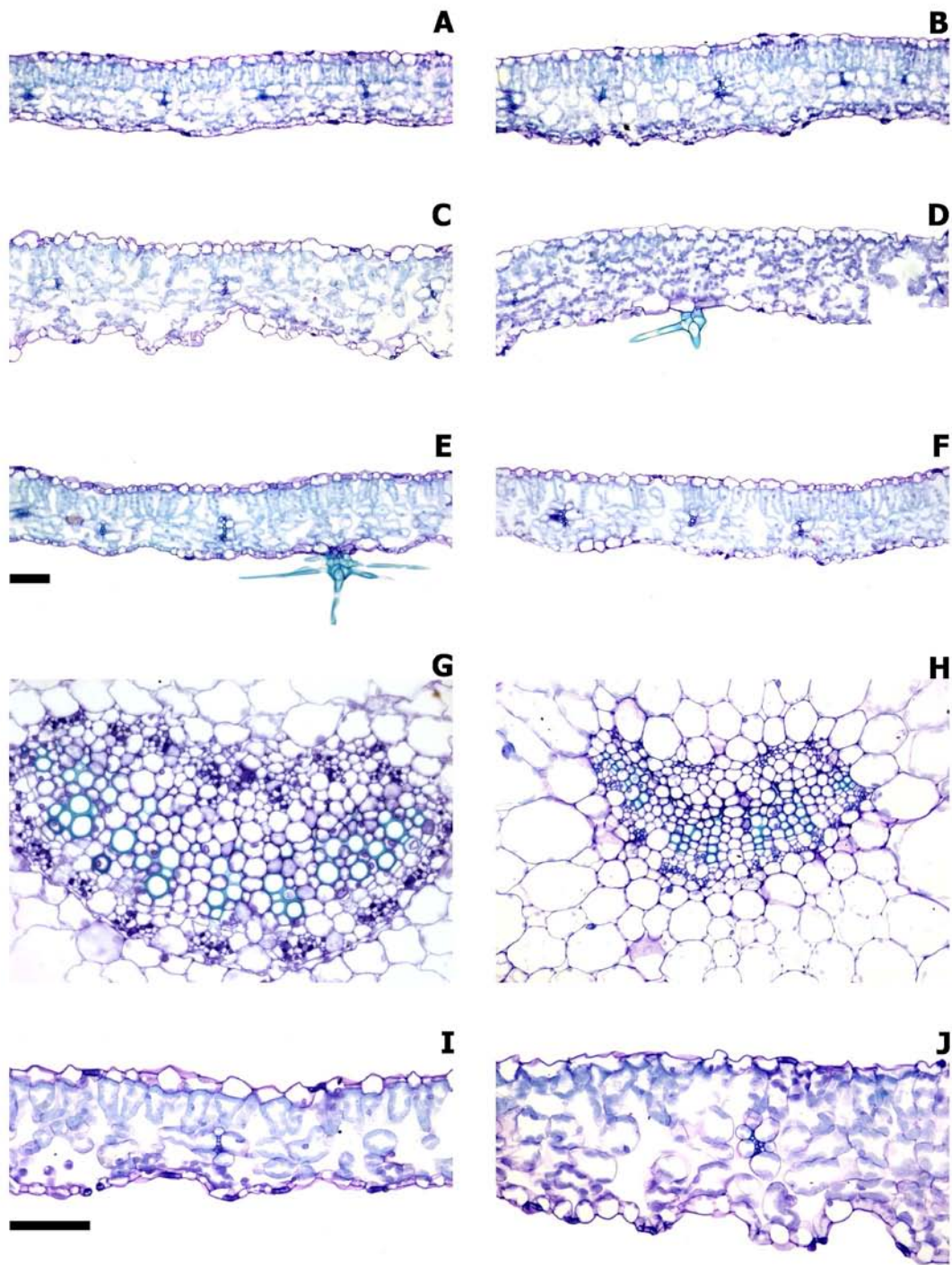


Figura 6. Influência do tipo de vedação durante o alongamento de *Solanum melongena* a partir de ápice caulinar após 30 dias de cultivo nas características anatômicas, em cortes transversais. A e B – PVC; C e D – TCF; E e F – TCF, G – TCF; H - TSF; I e J - detalhe TSF. Barra = 100 μ m.

A área das células-guarda foi maior em ambas as faces da folha no TSF. Na face adaxial, não houve diferença entre o PVC e TCF. Enquanto que na face abaxial, o TSF foi seguido por PVC e pelo tratamento TCF, no qual foi verificada a menor área (Figura 7C).

O índice é uma boa indicação da proporção real de estômatos encontrados nas folhas. Observou-se que o índice estomático (IE) foi maior e diferente estatisticamente na face abaxial, mantendo o padrão inicialmente encontrado, na característica número de estômatos (NE). Porém, o PVC não diferiu do TCF na face abaxial, enquanto que na face adaxial o índice de estômatos no PVC foi superior aos demais (Figura 7D).

Todas as variáveis foram significativas para todos tratamentos, o que nos indica os possíveis efeitos sobre a morfogênese, propagação, aclimação, hiperidricidade do tipo de vedação utilizada no cultivo *in vitro*.

Tabela 4. Resumo da análise de variância das características anatômicas demonstrando a influência do tipo de vedação na obtenção de plântulas durante o alongamento de *Solanum melongena* ‘Embu’ a partir do ápice caulinar após 30 dias.

F.V.	GL	QM			
		NE	NCE	ACG	IE
Face da folha	1	1118,05*	5947,69*	8288,82	59476940.28*
Tipo de vedação	2	118,90	1167,31	22415,39	11673137.05
Interação	2	32,19*	310,69*	3276,02*	3106909.72*
Resíduo	294	2,42	22,55	323,42	225508.22
Média Geral		5,88	23,29	136,21	2429.07
C.V.		26,48	20,39	13,20	19.55

* Significativo a $p < 0,05$ pelo teste F. NE = número de estômatos; NCE = número de células epidérmicas; ACG = área das células-guarda; IE – índice estomático.

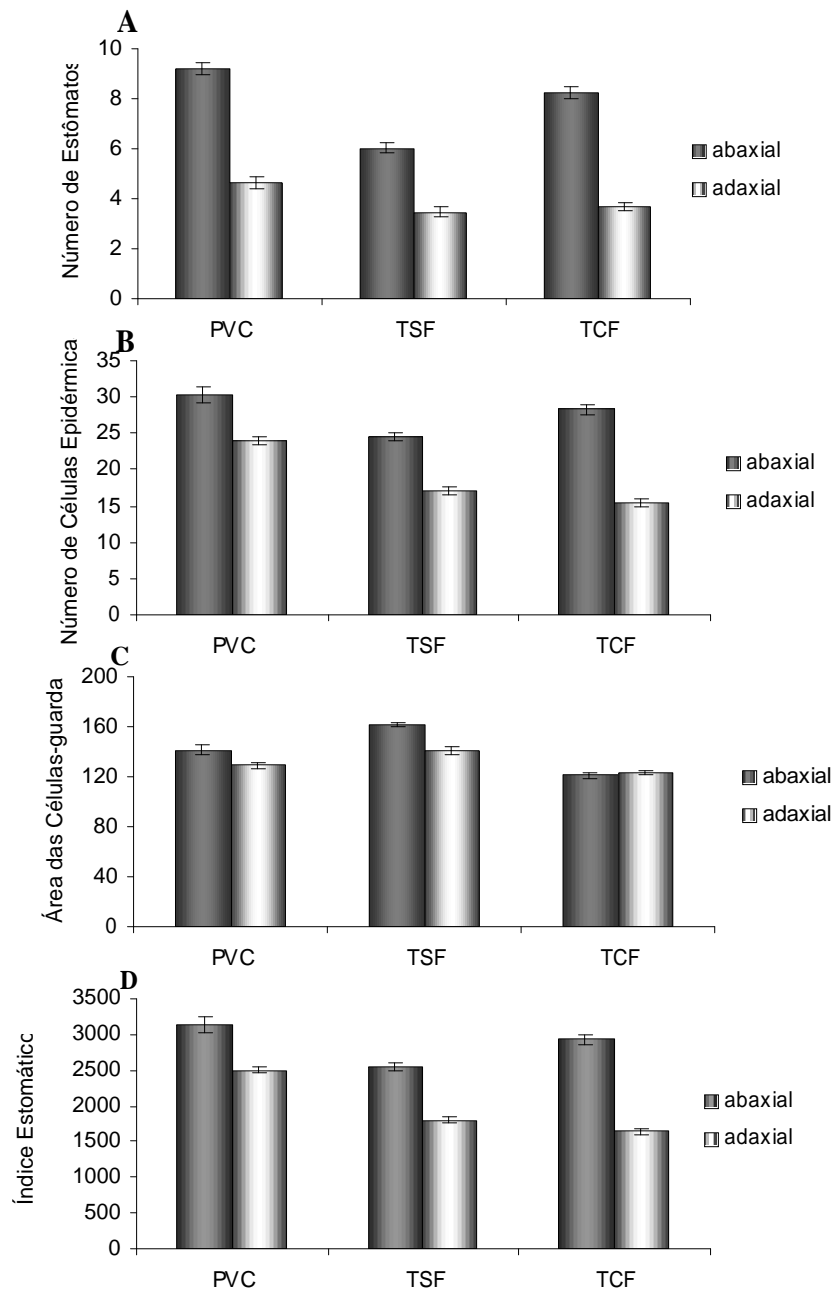


Figura 7. Influência do tipo de vedação nas características anatômicas de plântulas de *Solanum melongena* multiplicadas a partir do ápice caulinar, após 30 dias. As barras verticais indicam os erros padrões da média.

DISCUSSÃO

Os fatores físicos afetam consideravelmente o crescimento e desenvolvimento de plântulas *in vitro*. Assim, o controle do ambiente pode ser essencial para obter plântulas de boa qualidade, na data desejada e com baixo custo de produção (NGUYEN e KOZAI, 1998; NGUYEN *et al.*, 1999; ZOBAYED *et al.*, 2001a; MARINO e BERNARDI, 2004).

Nos experimentos conduzidos no presente trabalho, quando os cotilédones foram mantidos em meio MS acrescido de 10 mg L⁻¹, observou-se que o tipo de vedação não influenciou as características analisadas, exceto para o peso da matéria fresca (PMF). Nesta característica observa-se que o PVC e Parafilm[®] foram estatisticamente superiores ao Micropore[®].

Sabe-se que o Micropore[®] é o tipo de vedação que permite uma maior troca gasosa e foi visível a perda de água do meio ao longo do experimento. Esse aumento nas trocas gasosas teve um efeito negativo na formação de calos, e não foi observado efeito na formação de embriões somáticos. Resultados estes que discordam de SAITO e NISHIMURA (1994), que apesar de não terem utilizados os mesmos tipos de vedação, obtiveram melhoria na resposta embriogênica quando os explantes foram colocados em condições de maior troca gasosa.

MARINO e BERARDI (2004) observaram que as concentrações de etileno e dióxido de carbono foram maiores em placas de Petri vedadas com Parafilm[®] quando comparadas com PVC. Entretanto, em nossos experimentos espera-se poucas trocas gasosas no Parafilm[®], porém observou-se, no final do experimento, fendas ao longo da vedação com Parafilm[®]. Estas fendas provavelmente permitiram uma maior troca gasosa e conseqüentemente influenciaram nos resultados obtidos, tanto nas condições indutoras de embriogênese quanto na organogênese. Influência semelhante foi observada por (GONÇALVES, 2004),

que discute o impacto causado na concentração de O₂ e CO₂ no ambiente interno dos frascos, devido a presença de frisos nas tampas utilizadas por este autor.

Um ambiente com maior troca gasosa influenciou a multiplicação dos ápices caulinares, no qual, obteve-se um maior peso da matéria fresca e seca, diâmetro do caule, largura e comprimento das folhas. A literatura esta de acordo com esses resultados no qual, NGUYEN *et al.* (1999) e KUBOTA *et al.* (2001) observaram que a alta troca gasosa, em conjunto com o cultivo fotoautotroficamente aumentaram o peso seco das plântulas em cerca de duas vezes mais do que nas condições controle.

De acordo também com MILLS *et al.* (2004), que observaram que no tratamento de ventilação intermediário, os propágulos alongaram a uma extensão maior e produziram mais biomassa seca que os propágulos crescidos sem ventilação.

O tipo de vedação também influenciou todas as características anatômicas analisadas. Assim como ZOBAYED *et al.* (2001a), observamos que nas condições de maior troca gasosa as células estavam mais próximas com pequenos espaços intercelulares. Além disso, os tecidos apresentaram uma maior organização.

Nossos resultados foram semelhantes aos observados por ZOBAYED *et al.* (2001b), que encontraram nas folhas das plântulas de *Brassica oleraceae* e de *Nicotiana tabacum* com ventilação forçada e *in vivo* camadas de parênquima paliçádico e lacunoso mais definidas. Os mesmos autores determinaram que a espessura da folha e a integridade estrutural nas folhas das plântulas mantidas *in vivo* foram maiores do que sob ventilação forçada.

Os estômatos foram observados em ambas as faces da epiderme e em todos os tratamentos. O número de estômatos e a sua capacidade de funcionar normalmente são características importantes para a sobrevivência da planta durante a aclimação.

A presença de estômatos funcionais induzidos em um microambiente aerado ou por baixa umidade no frasco, aumentou a qualidade e a sobrevivência das plantas (NAVATEL e BOURRAIN, 1994). Não foi avaliada a funcionalidade dos estômatos neste trabalho, porém observou-se que o seu número variou

dependendo do tipo de vedação. O maior número de estômatos encontrado foi nas folhas mantidas em frascos vedados com PVC, esses dados contrastam com aqueles relatados por ZOBAYED *et al.* (2001a), que observaram que a densidade dos estômatos foi relativamente altas nas folhas sujeitas ao tratamento com trocas gasosas, e foi aproximadamente 1,3 vezes maior que no controle. O PVC permite uma pequena troca gasosa entre o frasco e o ambiente externo, principalmente quando comparado com a TCF.

Com relação à área das células-guarda, observa-se que TSF foi estatisticamente superior aos demais, provavelmente devido ao tipo de vedação, que resultou em interceptação com substancial redução da irradiância, em relação ao filme plástico de PVC. Esta redução, em conjunto com uma menor troca gasosa, diminuiu o grau de diferenciação dos tecidos, mesmo em órgãos aparentemente expandidos. Este fato aliado à presença de estômatos em ambas as faces, menor deposição de cutícula e parede em células de órgãos oriundos do cultivo *in vitro* pode dificultar o processo de aclimação e reduzir a taxa de sobrevivência do material transferido.

À luz dos resultados, o tipo de vedação influenciou na resposta morfogênética, sugerindo que a maior troca gasosa pode ter efeitos positivos na resposta, como é o caso da indução de organogênese e alongamento de ápices caulinares. Contudo, sua influência pode ser nula ou ainda negativa, como na indução de embriogênese somática em berinjela, ressaltando a importância da necessidade de se avaliar, para cada espécie-alvo de pesquisa, influência do tipo de vedação em suas respostas morfogênicas.

Sugere-se para futuros trabalhos de propagação *in vitro* de berinjela, mediados pela organogênese, uma utilização mais ampla de filtros que permitam maiores trocas gasosas, pois além de melhorar na resposta obtida, também influencia positivamente na sobrevivência das plantas na fase de aclimação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN-CRISTIE, J., T. KOZAI, M. LILA-SMITH. 1995. Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- CHEN, C. 2004. Humidity in plant tissue culture vessels. *Biosystems Engineering* 88:231-241.
- CRUZ, C.D. 2001. Programa GENES. Editora UFV. Release Versão Windows. Editora UFV, Viçosa.
- GAMBORG, O.L., R.A. MILLER, K. OJIMA. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- GONÇALVES, L.A. 2004. *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae): anatomia, citogenética, citometria de fluxo e propagação *in vitro*. Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- JEONG, B.R., K. FUJIWARA, T. KOZAI. 1995. Environmental control and photoautotrophic micropagation. *Hortic. Rev.* 17:123-170.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant Microtechnique McGRAW-Book, New York.
- KOZAI, T., C. KUBOTA, B.R. JEONG. 1997a. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 51:49-56.
- KOZAI, T., N.T. QUYNH, C. KUBOTA. 1997b. Environmental control and its effects in transplant production under artificial light. *J. Kor. Soc. Hortic. Sci.* 38:194-199.
- KUBOTA, C., N. KAKIZAKI, T. KOZAI. 2001. Growth and Net photosynthetic rate of tomato plantlets during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation. *HortScience* 36:49-52.
- LAI, C.C., T.A. YU, S.D. YEH, J.S. YANG. 1998. Enhancement of *in vitro* growth of papaya multishoots by aeration. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 53:221-225.

- MARINO, G., G. BERARDI. 2004. Different sealing materials for petri dishes strongly affect shoot regeneration and development from leaf explants of Quince 'BA 29'. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 40:384-388.
- MILLS, D., Z. YANQING, A. BENZIONI. 2004. Improved of jojoba shoot multiplication *in vitro* by ventilation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 40:396-402.
- MURASHIGE, T., F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- NAVATEL, J.C., L. BOURRAIN. 1994. Influence of the physical structure of the medium on *in vitro* rooting. *Adv. Hort. Sci.* 8:57-59.
- NGUYEN, Q.T., T. KOZAI. 1998. Environmental effects on the growth of plantlets in micropropagation. *Environ. Control Biol.* 36:59-75.
- NGUYEN, Q.T., T. KOZAI, U.V. NGUYEN. 1999. Effects of sucrose concentration, supporting material and number of air exchanges of the vessel on the growth of *in vitro* coffee plantlets. *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.* 58:51-57.
- SAITO, T., S. NISHIMURA. 1994. Improved culture conditions for somatic embryogenesis using an aseptic ventilative filter in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Sci.* 102:205-211.
- SCIUTI, R., S. MORINI. 1995. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. *J. Hortic. Sci.* 70:221-228.
- ZOBAYED, S.M.A. 2000. *In vitro* propagation of *Lagerstroemia* spp. from nodal explants and gaseous composition in the culture headspace. *Environ. Control Biol.* 38:1-11.
- ZOBAYED, S.M.A., F. AFREEN, T. KOZAI. 2001a. Physiology of Eucalyptus plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 37:807-813.
- ZOBAYED, S.M.A., F. AFREEN, Y. XIAO, T. KOZAI. 2004. Recent advances in research on photoautotrophic micropropagation using large culture vessels with forced ventilation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 37:450-458.
- ZOBAYED, S.M.A., J. ARMSTRONG, W. ARMSTRONG. 2001b. Leaf anatomy of *in vitro* tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. *Plant Sci.* 161:537-548.

CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições que foram realizados os experimentos e a partir dos resultados obtidos, conclui-se que:

- ✘ As características analisadas também podem ser utilizadas como descritores de berinjela, sendo que o número de grupos formados pelo método de otimização de Tocher foi satisfatório.
- ✘ A germinação foi influenciada pela concentração dos sais, tipo de agente gelificante e a interação entre ambos. Enquanto que na indução de embriogênese e de organogênese não houve diferença quando utilizadas plântulas crescidas em meio MS metade da força e força completa solidificado com Ágar, Agargel ou Phytigel. Observou-se que o melhor tratamento foi o meio com 50% da concentração de sais MS quando utilizou-se de ápices caulinares de berinjela para multiplicação.
- ✘ O Retain[®], em geral, apresentou efeitos negativos quando comparado com o AVG na morfogênese, exceto pela indução direta de estruturas semelhantes a embriões somáticos.
- ✘ Uma maior troca gasosa tem efeito positivo quando induzido organogênese em berinjela a partir de hipocótilos e os ápices caulinares são alongados. Porém, não tem efeito quando é induzida embriogênese somática em cotilédones.