

Estabelecimento *in vitro* e indução de calos em lichia (*Litchi chinensis* Sonn).

Corrêa, Ricardo Monteiro ¹, José Eduardo Brasil Pereira Pinto²; Érika Soares Reis³; Wagner Campos Otoni⁴, Carolina Mariane Moreira⁵.

¹ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Dep. de Agricultura, C.P. 3037, Campus UFLA. 37200-000, Lavras-MG. e-mail: ricardomonc7@yahoo.com.br. ²Professor – UFLA, e-mail: jeduardo@ufla.br. ³Mestre em Agronomia/Fitotecnia. UFLA, e-mail: erikasreis@yahoo.com.br.; ⁵ Professor, Universidade Federal de Viçosa, wotoni@ufv.br; ⁴ Acadêmica do curso de Biologia – UFLA.

INTRODUÇÃO

A lichia é uma frutífera originária da China, sendo considerada em todo o mundo como a “Rainha das frutas” por sua aparência e sabor delicado, semelhante ao da uva “Itália” e com aspecto similar a um morango.

No Brasil, as regiões de expressiva produção são os estados de São Paulo e Paraná. A comercialização desta fruta no Brasil ainda é pequena, concentrando-se em algumas cidades de maior porte como São Paulo e Rio de Janeiro. O preço da fruta *in natura* oscila entre R\$ 5,00 e R\$ 15,00/kg dependendo da região.

As pesquisas em torno da lichieira têm sido intensificadas nos últimos anos. No entanto, no Brasil, apesar da potencialidade de exploração comercial da cultura, os poucos estudos realizados centralizam-se nos frutos e não na planta como um todo.

A propagação da lichieira pode ser realizada tanto de forma sexuada quanto assexuada. Por via sexual, a propagação de lichia apresenta alguns entraves como perda rápida de viabilidade, ocorrência de segregação varietal e presença de longo período juvenil (10 anos ou mais para começar a produzir frutos). Assexualmente, ela é propagada via alporquia, enxertia ou estaquia, sendo a alporquia o método mais comum. A alporquia apresenta consideráveis obstáculos à expansão da cultura no Brasil, pois além dela ser considerado um procedimento caro, esse método de propagação possui baixo rendimento e produz pequeno número de mudas por planta matriz. Além disso, a alporquia proporciona graves danos à planta matriz, devido à quantia de anelamentos efetuados (Raharjo e Litz, 2005).

O Brasil tem elevado potencial para se tornar grande produtor desta fruta, podendo gerar excedentes para exportação, visto que o país possui clima propício para expansão desta cultura, que se adapta bem ao clima subtropical.

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica que permite otimizar o processo produtivo de muitas espécies vegetais, fazendo com que espécies de difícil propagação sejam multiplicadas *in vitro*. Plântulas germinadas *in vitro* a partir de sementes são excelentes fontes de explantes para diversos processos *in vitro* devido à sanidade e vigor das plântulas obtidas.

Assim, alternativas de propagação assexual por cultura de tecidos para a lichieira podem ser úteis para sanar estes entraves de propagação desta espécie otimizando o processo produtivo. Todavia, são restritos os trabalhos na literatura visando à propagação via cultura de tecidos desta espécie. Raharjo e Litz (2005) mostraram que é possível regenerar plantas de lichia cv. ‘Brewster’ por meio da embriogênese somática a partir de embriões imaturos, sendo o primeiro relato de embriogênese somática em lichia.

O objetivo deste trabalho foi estudar a germinação de sementes de lichia *in vitro* em função de agentes de desinfestação e avaliar o potencial de explantes foliares juvenis na indução de calos.

METODOLOGIA

Os ensaios foram conduzidos no laboratório de cultura de tecidos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período de Janeiro a março de 2006. Inicialmente, frutos de lichia (*Litchi chinensis* Sonn.) cv. Bengal foram coletados de plantas adultas localizadas no município de Ijaci-MG. As sementes foram isoladas dos frutos e

selecionadas descartando-se as sementes com poucas reservas e/ou injuriadas.

Ensaio I: Germinação de sementes de lichia em função de agentes de desinfestação.

As sementes obtidas na etapa anterior foram imersas em água corrente por 4 horas e posteriormente reservadas para os processos de assepsia. O processo de assepsia consistiu na combinação dos agentes de desinfestação: Hipoclorito de sódio (HS: Água sanitária comercial com 2,5% de cloro ativo) e água oxigenada (3 volumes) de acordo com os seguintes tratamentos: 1) Testemunha (sem assepsia); 2) HS a 0,75%; 3) HS a 1,25%; 4) HS a 1,75%; e 5) HS a 2,5% sendo todos os tratamentos 2, 3, 4 e 5 combinados com água oxigenada 3 vol.. As sementes foram imersas por 20 minutos nas soluções desinfestantes de acordo com os tratamentos e, posteriormente, imersas em água oxigenada por 10 minutos. As sementes após serem desinfestadas foram lavadas 3 vezes em água destilada autoclavada e inoculadas em câmara de fluxo laminar inoculando-se 2 sementes por frasco. O meio de cultura foi o MS (Murashige e Skoog, 1962) líquido com $\frac{1}{4}$ da força (concentração) dos sais e sem sacarose de acordo com o protocolo de Corrêa et al. (2006) para germinação *in vitro* de lichia, sendo que cada frasco (300 mL) continha alíquotas de 20 mL de meio.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 8 repetições e a parcela experimental composta por 4 frascos e 2 sementes por frasco. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas.

Ao final de 15 dias foram avaliadas a percentagem de germinação de sementes e a percentagem de contaminação por fungos e bactérias.

Ensaio II: Indução de calos em explantes foliares de lichia.

Plântulas de lichia obtidas *in vitro* no ensaio I foram doadoras de explantes para os ensaios de indução de calos. Folhas jovens (cerca de 3 mm²) foram isoladas das plântulas matrizes para a indução de calos.

Neste ensaio foram avaliadas cinco concentrações de 2,4-D em duas condições de indução (claro e escuro), sendo um ensaio conduzido no ambiente claro e o outro ensaio conduzido no ambiente escuro de acordo com as concentrações de 2,4-D descritas abaixo. O meio indutor foi o MS sólido (0,2% de Phytigel) e 3% de sacarose contendo as seguintes concentrações de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D): 1) MS sem regulador; 2) MS + 9,05 µM de 2,4-D; 3) MS + 18,1 µM de 2,4-D; 4) MS + 27,1 µM de 2,4-D; 5) MS + 36,2 µM de 2,4-D.

Segmentos foliares de 1 cm² foram isolados de plântulas de lichia pré-estabelecidas *in vitro* e inoculadas em tubos de ensaio (7,5 mm x 28 mm) sendo posteriormente mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas para o ensaio conduzido no ambiente claro (irradiância de 25 µM m⁻² s⁻¹) e temperatura de 25 ± 1 °C sob ausência de luz para o ensaio conduzido no escuro.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 8 repetições (1 explante foliar por tubo) e a parcela experimental composta por 4 tubos de ensaio.

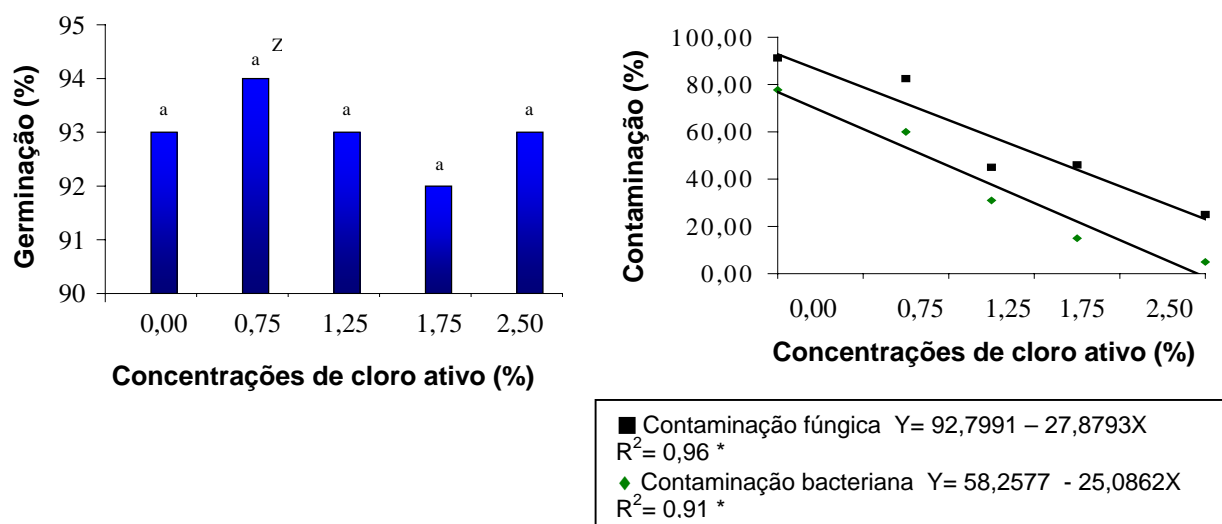
Ao final de 45 dias foram avaliados a percentagem de explantes com calos e a percentagem da área do explante coberta com calos.

Os dados obtidos nos ensaios I e II foram submetidos a análise de variância e os tratamentos analisados por teste de F e regressão polinomial a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeito dos agentes de desinfestação na percentagem de germinação de sementes de lichia *in vitro* ($p < 0,05$). Porém, para a percentagem de contaminação fúngica e bacteriana houve efeito significativo dos agentes de desinfestação. Observou-se que o HS

combinado com a água oxigenada não interferiu na germinação das sementes, evidenciando que a solução de HS pode ser usada sem maiores diluições na desinfestação de sementes de lichia. No entanto, a percentagem de contaminação das sementes foi reduzida com a adição de concentrações crescentes de HS, sendo mínima a contaminação quando desinfestada com 2,5% de cloro ativo (HS sem diluição). Todos os tratamentos com concentrações de hipoclorito também foram desinfestados com água oxigenada 3 vol. evidenciando que a contaminação bacteriana foi reduzida com a presença deste agente, chegando a valores mínimos quando foi combinada com 2,5% de cloro ativo (HS) (Figura 1).

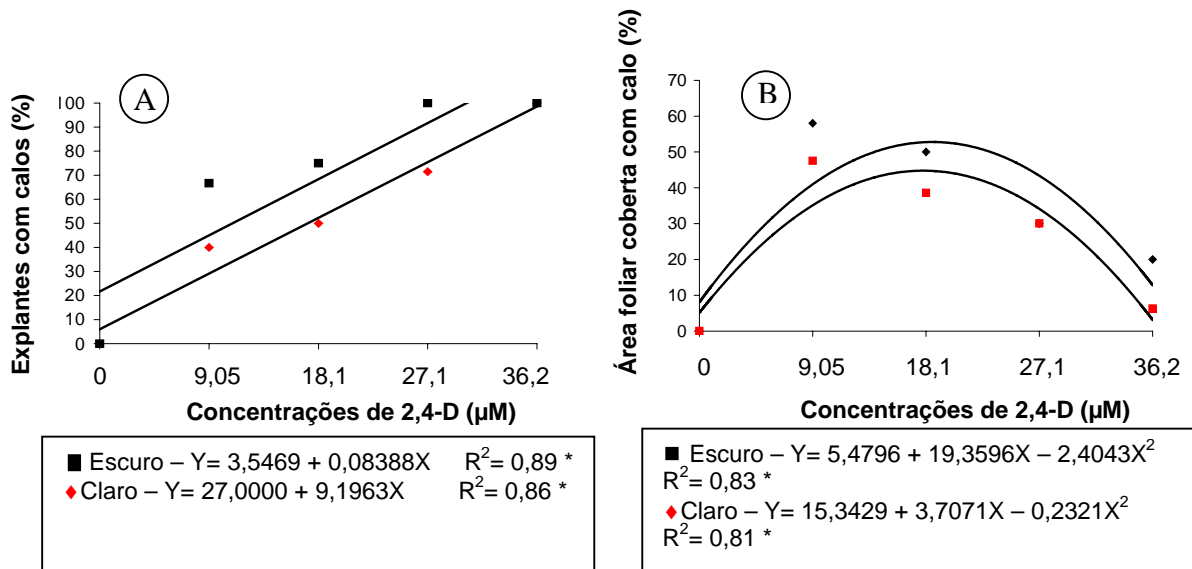


Z – As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Significativo ao nível de 5% pelo teste de F.

Figura 1: Percentagens de germinação e de contaminação fúngica e bacteriana de sementes de lichia germinadas *in vitro* em meio ¼ MS sem sacarose em função de concentrações de cloro ativo.

Diferentes concentrações de 2,4-D influenciaram significativamente a percentagem de explantes com calos e a percentagem da área foliar com calogênese ($p < 0,05$). Observou-se efeito linear para as concentrações de 2,4-D para a percentagem de explantes com calos tanto no claro quanto no escuro (Figura 2A). Porém, para a percentagem da área foliar coberta com calos houve tendência quadrática das concentrações de 2,4-D, sendo que no escuro foi obtida maior percentagem de área coberta (55,66% da área do explante cultivado em 19,2 μM de 2,4-D) em relação ao ambiente claro (Figura 2B).

Santos et al. (2005) relata que para *Salix* (*Salix humboldtiana*) maior percentagem de explantes com calos e maior cobertura da área foliar por calos foi obtida na dosagem de 27,1 μM de 2,4-D, embora os explantes tenham sido cultivados no claro. Já Almeida et al. (2001) relata que para o mamoeiro calos (oriundos de explantes foliares e cotiledonares) cultivados no escuro induzem a maior formação de calos friáveis embriogênicos.



* Significativo ao nível de 5% pelo teste de F.

Figura 2: Percentagem de explantes com calos (A) e percentagem da área foliar coberta com calos (B) em função de concentrações de 2,4-D cultivados no ambiente claro e escuro.

No presente trabalho os calos obtidos de lichia tanto no claro quanto no escuro não foram friáveis; testes histoquímicos (com os corantes carmin acético e azul de Evans) para identificação de células embriogênicas confirmaram que os calos de lichia obtidos neste ensaio não apresentaram características embriogênicas.

CONCLUSÕES

Nas condições em que os ensaios foram realizados conclui-se que o cloro ativo combinado com água oxigenada são efetivos no controle das contaminações fúngicas e bacterianas durante a germinação *in vitro*.

Maior percentagem de explantes foliares coberto com calos é obtido em meio de cultivo contendo 19,2 µM de 2,4-D.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E.P; OLIVEIRA, R.P.; DANTAS, J. L.L. Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. *Scientia Agrícola*, v.58, n.1, Piracicaba, 2001.

CORRÊA, R.M.; PINTO, J.E.B.P.; REIS, E.S.R. Germinação *in vitro* de lichia. In: XV Congresso dos Pós-Graduandos da Universidade Federal de Lavras-UFLA. Lavras-MG. 2006.

SANTOS, B.R; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, P.D.O. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix (Salix humboldtiana Willd)*. *Revista Ciência Rural*, v.35, n.3, Santa Maria, 2005.

RAHARJO, S.H.T.; LITZ, R.E. Clonal regeneration of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) via somatic embryogenesis. In: International Symposium on Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species. Daytona Beach, Florida, 2005.

PALAVRAS-CHAVES: *Litchi chinensis* Sonn., germinação *in vitro*, indução de calos.