

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Brosimum guadichaudii* Tréc.
(Mama-Cadela) UMA ESPÉCIE CONSIDERADA
MEDICINAL**

IRACI FIDELIS

1998

IRACI FIDELIS

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Brosimum guadichaudii* Tréc. (Mama-Cadela) UMA
ESPÉCIE CONSIDERADA MEDICINAL**

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

Orientador

Into

MINAS GERAIS - BRASIL
1998

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

Fidelis, Iraci

Micropropagação de *Brosimum guadichaudii* Tréc. (mama-cadela) uma espécie considerada medicinal / Iraci Fidelis. – Lavras : UFLA, 1998.

109 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Mama-cadela. 2. *Brosimum guadichaudii*. 3. Moraceae. 4. Planta medicinal.
5. Planta lenhosa. 6. Micropropagação. 7. Anatomia. 8. Cerrado. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.883962

-634.36043

IRACI FIDELIS

MICROPROPAGAÇÃO DE *Brosimum guadichaudii* Tréc. (Mama-Cadela) UMA ESPÉCIE CONSIDERADA MEDICINAL

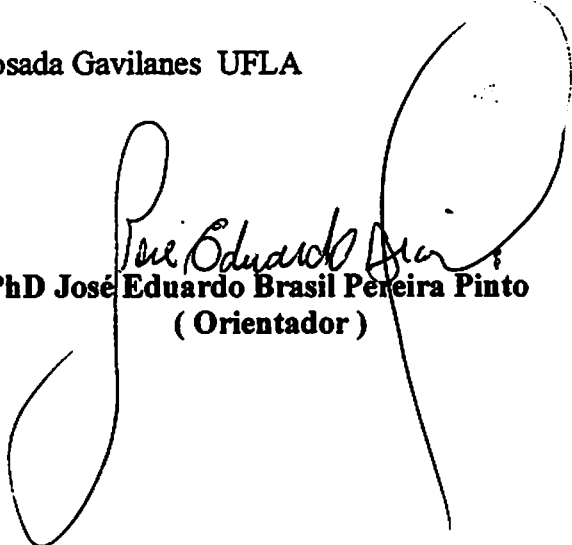
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre"

APROVADA em 28 de agosto de 1998

Prof. MS Evaristo Mauro de Castro UFLA

Prof. PhD Magdy Ahmed I. Alloufa UFRN

Prof. MS Manuel Losada Gavilanes UFLA


Prof. PhD José Eduardo Brasil Pereira Pinto
(Orientador)

**DEDICO ESTE TRABALHO
AO MEUS PAIS E IRMÃOS**

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Deus por tudo.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pela orientação, amizade e constante incentivo.

Ao Professor Evaristo Mauro de Castro pela colaboração na realização dos estudos anatômicos.

Aos Professores integrantes da Banca Examinadora pela sugestões.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Maria das Graças Cardoso, pela amizade.

Aos colegas, funcionários e amigos do laboratório de cultura de tecidos vegetais.

Ao meu irmão pela correção.

Aos bibliotecários da UFLA pela atenção dispensada.

Enfim, a todos, nossos sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
1 RESUMO.....	i
2 ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO I.....	1
PANORAMA GERAL DE PLANTAS MEDICINAIS.....	1
3 INTRODUÇÃO GERAL	1
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO II.....	18
ESTABELECIMENTO "IN VITRO" COM SEGMENTOS NODAIS.....	18
1 RESUMO.....	18
2 ABSTRACT.....	19
3 INTRODUÇÃO.....	20
4 REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6.1 Estabelecimento "in vitro" de segmentos nodais a partir de sementes.....	32
6.2 Efeito de TDZ na proliferação "in vitro" de broto em segmentos nodais.....	33
6.3 Efeito do pH e AIB no enraizamento "in vitro" de segmentos nodais.....	36
2.5 CONCLUSÕES.....	40
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
CAPÍTULO III.....	46
EFEITOS DO TEGUMENTO, LUZ, MEIOS DE CULTURA, FITOREGULADORES, CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NA GERMINAÇÃO.....	46
1 RESUMO.....	46

3 INTRODUÇÃO.....	47
4 REFERENCIAL TEÓRICO.....	49
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
6.1 Germinação de sementes "in vitro" na presença ou não de luz com ou sem tegumento.....	57
6.2 Germinação de sementes "in vitro" em diferentes concentrações de sacarose do meio MS.....	61
6.3 Germinação de sementes "in vitro" nos meios WPM e MS com TDZ.....	69
7 CONCLUSÕES.....	73
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
CAPÍTULO IV.....	80
ESTUDO COMPARATIVO ANATÔMICO DE PLANTAS DESENVOLVIDAS "IN VIVO" E "IN VITRO.....	80
1 RESUMO.....	80
2 ABSTRACT.....	81
3 INTRODUÇÃO.....	81
4 REFERENCIAL TEÓRICO.....	83
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	88
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
7 CONCLUSÕES.....	102
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
CONSIDERAÇÃO FINAL.....	108

1. RESUMO

FIDELIS, Iraci. Micropropagação de *Brosimum gaudichaudii* Tréc.(Mamacadela) Uma Espécie Considerada Medicinal. Lavras: UFLA, 1998. 109p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia)*

A espécie *Brosimum gaudichaudii* Tréc.(Moraceae), nativa dos cerrados brasileiros, é uma importante planta considerada medicinal usada no tratamento da doença de pele. Sendo a exploração extrativista, pode levá-la ao desaparecimento; principalmente por ser difícil sua propagação tanto por estacas como por sementes (recalcitrante). Plantas foram regeneradas a partir de segmentos nodais obtidos de "seedlings" de *B. gaudichaudii* "in vitro". Avaliaram-se os números de segmentos nodais obtidos de três repicagens da mesma semente no meio de cultura MS. Posteriormente, segmentos nodais foram cultivados no meio MS, suplementado com TDZ (0, 1, 2, e 3 mg/L) para indução de brotos ou calos. Segmentos nodais foram induzidos a rizogênese em meio líquido com 1/4 dos sais do MS, variando o pH da solução (3,5; 4,5; 5,5 e 6,5) suplementado ou não com 1,0 mg/l de AIB. Após 3 repicagens num período de 88 dias foi obtida uma taxa de multiplicação de 3,54 segmentos nodais. Não se registraram diferenças significativas na regeneração entre os tratamentos com TDZ. Os segmentos nodais enraizaram-se melhor com o pH mais ácido e suplementado com AIB.

Os parâmetros: regime de luz, diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e reguladores de crescimento na germinação de sementes e multiplicação de *B. gaudichaudii* foram avaliados, concluindo que as sementes germinadas "in vitro", sob um regime de 16/8 horas luz/escuro e desprovidas de tegumento, desenvolveram-se melhor.

A concentração de sacarose até 6% foi efetiva para a obtenção de um maior número de gemas, de brotos e raízes. Quanto a indução de brotações e calos a partir de sementes, o melhor meio foi o MS. O regulador de crescimento TDZ afetou o tamanho de brotações.

Reportou-se uma comparação anatômica "in vivo" e "in vitro" dessa planta. Organizações anatômicas dos tecidos foram diferentes in vivo e "in vitro". "In vivo" uma seção transversal da folha mostrou uma camada de células de parênquima paliçádico e duas camadas de células parênquima lacunoso. "In vitro" o mesofilo consistia de 3-4 camadas de células sem diferença entre elas. O corte transversal do caule "in vitro" mostrou uma quantidade grande de tricomas que em "in vivo" não foi formado.

Comitê Orientador: José Eduardo B.P. Pinto - UFLA (Orientador), Evaristo Mauro de Castro - UFLA, Manuel Losada Gavilanes - UFLA

2. ABSTRACT

FIDELIS, Iraci. Micropropagation of *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Mama-Cadela) An Specie Considered Medicinal. Lavras: UFLA, 1998. 109p. (Dissertation - Masters degree in Agronomy)*

Brosimum gaudichaudii Tréc. (Moraceae) is considered an important Brazilian medicinal plant is commonly used in skin disorder (vitiligo). It is a native Brazilian bush called "mama-cadela" and of difficult propagation by cutting or seeds (recalcitrant).

Plant regeneration from nodal segments were obtained from seedlings of mama-cadela cultured "in vitro". Firstly, nodal segments number obtained from three subculture in MS medium were evaluated. In a second work, nodal segments were cultured in MS medium and supplemented with TDZ (0, 1, 2 and 3 mg/L) to induce shoots or callus. In a third trial, nodal segments were induced to rooting in liquid medium with 1/4 strength of the salts from MS, changing the pH of medium (3,5; 4,5; 5,5 and 6,5) supplemented or not with 1,0 mg/L IBA. After three subcultures, approximately 88 days, one average of 3,54 nodal segments was obtained. There were not significant differences in the regeneration between treatments supplemented with different amount of TDZ. The nodal segments showed better rooting with pH more acid and supplemented with IBA. Trials were evaluated under test of light, different culture medium, sucrose concentrations and growth regulator in the germination of seeds and shoot multiplication of mama-cadela. Seeds inoculated "in vitro" under 16/8 hours light/dark regime and without tegument showed the best growth. While seeds cultured in MS medium with different sucrose concentration showed difference statistics. The increase of sucrose until 6% was effective to obtain higher shoot number, shoot size and roots. Seeds inoculated in MS solid medium exhibited the best growth. The influence of thidiazuron on shoot length was effective. It was reported here anatomic comparison "in vivo" and "in vitro" of this medicinal plant. Anatomic organization of tissues reported between "in vivo" and "in vitro" were different. Cross section of a leaf "in vivo" showed one layer of parenchymatous palisade cells, and two layers of parenchymatous spongy cell. "In vitro", the mesophyll of the lamina consisted of 3-4 layers of cells without format difference among itself. Cross section of stems "in vitro" showed a lot of trichomas that "in vivo" it was not observed.

CAPÍTULO I

PANORAMA GERAL DE PLANTAS MEDICINAIS

3. INTRODUÇÃO GERAL

A crescente preocupação em usar produtos naturais vem provocando um interesse cada vez maior dos laboratórios farmacêuticos. Como o Brasil apresenta a mais ampla biodiversidade no mundo, é natural que aqui seja amplamente disseminado o uso de plantas e seus extratos para o tratamento de várias moléstias e sintomas (Silva, 1997).

Há evidências de que o homem pré-histórico já utilizava das plantas para diminuir os males físicos que o acometiam. Desde aqueles tempos até nossos dias, as plantas têm fornecido inúmeras substâncias de uso medicinal (Castro e Chemale, 1995).

Atualmente, o interesse pela fitoterapia e pela homeopatia, como opções terapêuticas, vem crescendo. Calcula-se que o Brasil disponha de algo entre 60 a 250 mil espécies vegetais, das quais 40% devem conter propriedades terapêuticas (Oliveira, Akissue e Garcia, 1993).

Com o propósito de incrementar esta área medicamentosa, o homem tem se valido da ciência que lhe possibilitou conhecer inúmeras substâncias e processos elaborados pela natureza para criar diversos outros compostos químicos de uso medicinal (Castro e Chemale, 1995).

A síntese de uma vasta gama de medicamentos tem levado os cientistas a sintetizar, em escala industrial, grande número de medicamentos existentes. O uso contínuo dos quimioterápicos sintéticos tem contribuído para evidenciar os efeitos colaterais indesejáveis de inúmeros destes medicamentos e, por outro lado, o surgimento de novas doenças, ou o retorno de outras consideradas

extintas, têm forçado os pesquisadores a lançar mão do inesgotável número de substâncias de espécies vegetais existentes no planeta (Castro e Chemale, 1995).

A indústria farmacêutica está se voltando novamente para os vegetais devido ao custo elevado dos medicamentos obtidos por via exclusivamente sintética. Esse custo, que era de US\$ 60 milhões na década de 40, saltou para US\$ 800 milhões nos anos 80 e é agora da ordem de US\$ 1 bilhão a US\$ 2 bilhões (Sertié, 1997).

Dos medicamentos disponíveis, 25% são originários de princípios ativos extraídos de vegetais. Nesse campo, o Brasil leva uma vantagem considerável. Das 350 mil espécies existentes no mundo, pelo menos 140 mil são tipicamente brasileiras. A pesquisa com fitoterápicos é a única chance de o Brasil competir no concorrido mercado mundial de desenvolvimento tecnológico, patenteando internacionalmente os extratos (Sertié, 1997).

As plantas medicinais são de grande interesse na biotecnologia; o estudo de métodos pelos quais o potencial produtivo de células vivas podem ser usadas em processos industriais e na produção de materiais na agricultura, florestas, horticultura e medicinais podem ser lucrativos. Pelo uso de cultura de tecidos, vários problemas na biotecnologia em plantas, tais como: micropropagação, biossíntese e biotransformação de compostos biologicamente ativos, armazenamento de células vegetais e engenharia genética de plantas superiores podem ser resolvidos (Rainert e Bajaj, 1977; Bajaj, 1986). Especial atenção tem sido dada à plantas que contêm compostos úteis à medicina e farmacologia. Como exemplos citam-se: *Catharanthus roseus* G.Don (Apocynaceae) que contem os alcalóides dimérico vincristina e vinblastina usados como agentes anticancerígeno; *Dioscorea deltoidea* Wall (Dioscoreaceae) que contem esteróides saponina-diosgenin usados para a produção de esteróides ou espécies de *Digitalis lanata* Ehrh. (Scrophulariaceae) a qual contém cardenolídeos como

digoxin e digitoxin. Estas plantas contêm estas substâncias as quais têm sido propagadas "in vitro".

As plantas medicinais são ainda uma importante fonte de materiais para indústria farmacêutica (Balandrin e Klocke, 1985), compreendendo 25% das drogas prescritas. Além de medicinais, outros produtos químicos que são ligados aos fármacos como narcóticos [ópio de *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae)], estimulantes [caféina de *Coffea arabica* L.(Rubiaceae)], venenos [coniína de *Conium maculatum* L.(Apiaceae)], inseticidas [piretróides de *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.(Asteraceae)], cosméticos e aromatizantes (vários óleos essenciais de plantas) são produzidos comercialmente. Alguns destes produtos são muito caros, como os quantificados por Balandrin e Klocke, (1985): alcalóides codeína e morfina purificados custam entre US\$ 650 e US\$ 1250 o kg e óleos essenciais de rosa podem valer de US\$ 2000 a 3000 por kg; éster de phorbol pode atingir o valor de US\$ 2000 por grama. O alcalóide anticancerígeno extraído de *Catharanthus* tem um valor de aproximadamente US\$ 2000 por grama (Curtin, 1983).

Brosimum gaudichaudii Tréc. (Moraceae) é uma espécie medicinal comumente utilizada no tratamento do vitiligo. Entretanto, a exploração extrativista, pode leva-la ao desaparecimento. Uma vez que não há relatos na literatura sobre sua propagação, este trabalho tem como objetivo propor um método de propagação "in vitro" e "in vivo", bem como um estudo comparativo das estruturas vegetativas desenvolvidas nestes mesmos ambientes, correlacionando com o processo adaptativo de aclimatização.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Produtos Secundários Como Alimentos

Produtos do metabolismo primário presentes nos alimentos, após serem processadas pela indústria de alimentos, muitos perdem características como a cor, o sabor e aromas. As indústrias de alimentos utilizam, então, para restaurar o aroma, a cor e o pigmento dos alimentos processados, agentes de condimentos, corantes, etc. Tem sido estimado que o mercado de condimentos em 1987 foi na ordem de US\$ 1,8 milhões e que o de fragrâncias somou US\$ 1,9 milhões (Pearce 1988). O mercado está aumentando na ordem de 5 a 6 por cento ao ano e em adição há uma crescente demanda para os então chamados condimentos naturais para o uso em produtos industrializados de consumo diário como bebidas, frutos, carnes, aves, frutos do mar e vegetais industrializados.

Os principais ingredientes naturais de condimento usado são os óleos essenciais que contêm terpenóides, resina de óleo e os condimentos não voláteis. Algumas das fontes comum de óleos essências e que são usados como condimentos na indústria de alimento estão listados na tabela 1 junto com sua tonelada e o custo em US\$ por kg em 1987.

TABELA 1-1 Principais óleos essenciais usados como agentes de condimento pelas indústrias de alimentos (Pearce 1988).

Fonte	Toneladas	US\$ por Kg	Terpenóide
Laranja	10000	1	Limonene
Hortelã-pimenta	6000	11	Menthol
Citronela	5000	11	Geraniol
Limão	3000	9-20	Limonene
Eucalyptus	2500	7	Cineol
Clove leaf	2000	3	Eugenol, caryophyllene
Hortelã	1500	10-20	Carvone
Lemongrass	1000	14	Citrol

4.2 Uso das Plantas como Fitoterápicos

A espécie humana tem feito uso de plantas medicinais desde o início das civilizações. Registros datados de 2000 à 2800 aC. encontrados em papíros egípcios e textos médicos dos chineses e indianos marcaram o início da vasta literatura sobre o uso de plantas medicinais (Craker, Chadwick e Simon, 1986).

Nos últimos trinta anos, um grande número de trabalhos científicos tem correlacionados algumas classes de substâncias produzidas por plantas e os efeitos que exercem sobre o organismo humano. Estas substâncias são em geral metabólitos secundários, cujas classes mais bio-ativas são alcalóides, flavonóides, glicosídeos, terpenóides, saponinas, lactonas e cumarinas (Balandrin e Klocke, 1985).

Balandrin e Kocke (1988) citam exemplos de metabólitos secundários economicamente importantes como glicosídeos digitálicos, escopolamina, morfina, pilocarpina, quinino e reserpina. Milhões de prescrições médicas são administradas pela preparação de produtos isolados de plantas, como os acima

citados. Segundo Balandrin e Kocke, algumas plantas superiores acumulam substâncias orgânicas em quantidade suficiente para serem interessantes do ponto de vista de viabilidade econômica para a indústria farmacêutica que prefere a extração à síntese destes compostos.

4.3-Aspectos das Plantas Medicinais no Mundo

O total de produtos de plantas medicinais comercializadas no mundo em 1980 ultrapassou US\$551 milhões com US\$208 milhões de produtos comercializados Hong Kong foi a primeira; seguida da Alemanha Ocidental (US\$57mi.), Japão (US\$47mi.) e França (US\$38mi.). Até a Europa Oriental está interessada, tendo havido um comércio superior a 400 diferentes tipos botânicos em 1980, com um peso de material de planta acima de 80.000 toneladas (Anon, 1982). Isto é pouco em termos de mundiais uma vez que se estima em cerca de 20000 espécies de plantas para uso medicinal (Penso, citado por Wood e Rhodes, 1990).

Nos Estados Unidos, Farnsworth e Soerjarto (1985) estimaram, em 1980, o consumo de US\$ 8 bilhões em drogas extraídas de plantas medicinais. As plantas superiores continuam sendo a fonte de material para 25 por cento dos ingredientes ativos contido nas prescrições da comunidade farmacêutica nos Estados Unidos (Farnsworth, 1984). A principal contribuição de produtos secundários para estas prescrições são os esteróides usados como hormônios sexuais ou como agentes anti-inflamatórios. Tais drogas são obtidas pela síntese parcial de isolados esteróides chamado saponinas. As plantas medicinais mais utilizadas nos Estados Unidos, de acordo com Loyde e Jackson (1986), são: beladona [*Atropa belladonna* L.(Solanaceae)], ipeca [*Cephaelis ipecacuanha* Rich. (Rubiaceae)], opium (*Papaver somniferun* L.), Rauwolfia [*Rauwolfia*

serpentine Benth ex Kurz.(Apocynaceae)] e digitais [*Digitalis purpurea* L. (Scrophulariaceae)].

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial usa medicações tradicionais (populares), mas só a partir de 1978 que se iniciou a definição de metas para que o estudo e o uso de plantas medicinais mostrasse a importância no contexto mundial.

4.4 Uso de Plantas Medicinais no Brasil

No Brasil, em 1982, a Central de Medicamentos (CEME) criou o Programa de Plantas Medicinais, visando desenvolver medicamentos a base de vegetais. Alguns resultados de pesquisas já estão disponíveis.

Dados mostram que o gasto com a importação de matérias-primas para fabricação de remédios sintéticos no Brasil (90% dos remédios sintéticos consumidos pela população) gira em torno de US\$ 2 a 3 bilhões por ano.

Por outro lado, pesquisas agrônomicas sobre o cultivo de plantas medicinais no Brasil para fins comerciais são reduzidas. Estudos sobre sementes ou materiais vegetativos padronizados com vistas à produtividade e trabalhos visando a algum tipo de melhoramento são em número muito reduzido. Alguns autores brasileiros destacaram a importância dos estudos agrônomicos em plantas medicinais brasileiras (Carlini, 1983; Matos, 1985; Elisabetsky, 1987); entretanto, as pesquisas são ainda escassas (Hertwig, 1986; Matos, 1988; Giagomets, 1989; Correia, Ming e Scheffer, 1991 e Martinus, et al., 1994). Loyd e Jackson (1986) mostraram que existe uma preocupação crescente relativa à conservação de plantas medicinais. Segundo eles, estas plantas têm sido multiplicadas ao longo dos tempos sem domesticação e, conseqüentemente, não foram selecionadas, visando à preservação de genes responsáveis por alta produtividade. Populações selvagens destas plantas constituem uma grande fonte

de recursos genéticos. Madueño-Box (1973) destaca a necessidade de produzir plantas medicinais não somente considerando sua biomassa mas, principalmente, os teores de princípios ativos nelas contidas, observando o fato de que a síntese desses princípios ativos pode ser alterada conforme as técnicas de cultivo.

TABELA 1-2 Algumas plantas consideradas medicinais utilizadas no Brasil (Balbachas, 1961).

Nome popular	Nome científico	Indicação
Alcachofra	<i>Cynara scolymus</i> L. (Asteraceae)	Escorbuto
Arruda	<i>Ruta graveolens</i> L. (Rutaceae)	Emenagogo
Boldo do chile	<i>Peumus boldus</i> Molina (Monimiaceae)	Tratamento bilis
Capim-limão	<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf (Poaceae)	Antiespasmódico
Espinheira-santa	<i>Chenopodium ambrosioides</i> Bert. ex Stend. (Chenopodiaceae)	Antisséptico cicatrizante
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill. (Myrtaceae)	Expectorante
Guaco	<i>Mikania glomerata</i> Spreng. (Asteraceae)	Broncodilatador
Guaraná	<i>Paullinia cupana</i> H.B.K. (Sapindaceae)	Contra dispepsia
Jaborandi	<i>Pilocarpus pennatifolius</i> Lem. (Rutaceae)	Hemoptise
Malva	<i>Malva silvestris</i> L. (Malvaceae)	Laxante
Pata de vaca	<i>Bauhinia forficata</i> Link. (Leguminosae - Caesalpinioideae)	Hipoglicemia
Quebra pedra	<i>Phyllanthus miruri</i> L. (Euphorbiaceae)	Diurético
Sabugueiro	<i>Sambucus nigra</i> L. (Caprifoliaceae)	Expectorante
Salva	<i>Salvia officinalis</i> L. (Lamiaceae)	Antiinflamatório

Gottlieb e Mors (1980) alertam no sentido de mostrar que o número de áreas devastadas cresce em velocidade muito mais acelerada do que a dos trabalhos científicos relacionados com plantas. Segundo Gottlieb e Mors (1980), mais da metade das espécies ocorrentes nestas regiões devastadas não são conhecidas do ponto de vista científico e muito pouco se sabe sobre a fitoquímica de mais de 99% das espécies encontradas na extensa flora do Brasil.

Balandrin e Klocke (1988), mostraram que apesar dos recentes avanços da tecnologia de extração, técnicas de separação (cromatografia), instrumentação analítica e espectroscopia, sabe-se ainda muito pouco sobre o metabolismo secundário da maioria das espécies de plantas superiores existentes, especialmente as presentes nas florestas tropicais.

Apesar da importância de certos compostos secundários, atualmente, encontram-se dificuldades de garantir o seu fornecimento. Das plantas que produzem esses metabólitos não esta a grande maioria ainda estabelecida como cultura, com rarríssimas exceções [*Papaver somniferum*, *P. bracteatum* (Papaveraceae), *Digitalis lanata*, *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert (Asteraceae), *Mentha piperita* L. (Lamiaceae) e *Cinchona spp* (Rubiaceae)] (Tyler, 1988); entretanto, a maioria faz parte de uma população selvagem, sendo, portanto, uma fonte esgotável de recursos. Além disso, o extrativismo não garante nem quantidade nem a qualidade do produto, em desacordo à exigência do mercado. Outro fato é o processo de domesticação de algumas plantas que leva à baixa produção ou mesmo não ocorre síntese do composto desejado, devido à não reprodutibilidade das condições ideais de síntese [ex.: *Pilocarpus spp* (Rutaceae) e *Catharanthus spp*].

4.5- A espécie *Brosimum gaudichaudii* Tréc.

A dificuldade de obtenção de mudas de boa qualidade em larga escala constitui, então, um sério problema para a seleção e propagação de plantas medicinais com alto rendimento para um metabólito desejado.

Brosimum gaudichaudii Tréc., popularmente conhecida como mamacadela, é arbustiva, caducifólia, nativa, de ocorrência nos cerrados brasileiros. É uma dicotiledônea subclasse Hamamelidae da família Moraceae. A planta apresenta um porte aproximadamente de 3 a 4 metros; possui látex; tendo casca cinzenta, grossa, folhas alternas, sem pelos na face superior e pilosa na face inferior; flores carnosas, com hastes, sem pétalas, agrupadas como globo; fruto originado de diversas flores, carnosos, amarelo e viscoso; não se abre quando maduro; frutifica e floresce durante todo ano; raiz pivotante; a madeira branca macia é utilizada na indústria de papel; o fruto é comestível e a semente é recalcitrante (Figuras 1-1 A e B e Figuras 1-2 A e B). Segundo Barroso et al. (1978), a família possui cerca de 40 gêneros e 1000 espécies, em geral, tropicais. No Brasil, constata-se a presença de 28 gêneros com aproximadamente 340 espécies. São árvores na sua maioria; havendo ainda várias espécies arbustivas e poucas herbáceas; todas elas, em geral, latescentes.

A constituição química de *Brosimum gaudichaudii* revelou a presença nas raízes e frutos de duas furanocumarinas (bergapteno e psoraleno). As furanocumarinas, uma subdivisão das cumarinas (Figura 1-3 A), pertencem aos grupos dos compostos fenólicos e são caracterizadas por apresentarem uma hidroxila ligada a um anel aromático. As furanocumarinas (Figura 1-3 B), são assim denominadas por terem um anel extra de furano. Bergapteno e psoraleno são substâncias fotossensibilizantes sobre a pele que são utilizadas no tratamento das discromias, principalmente vitiligo.

A dificuldade de enraizamento de estacas e a crescente ocupação dos cerrados pode levar esta espécie ao desaparecimento. Considerando que as sementes de mama-cadela são recalcitrantes o presente trabalho teve como objetivos: 1)- Avaliar o potencial da semente para produzir segmentos nodais (brotações) a partir do cultivo seguido por sucessivas repicagens nas brotações desenvolvidas na mesma semente. 2)- Indução de brotações ou calos em segmentos nodais obtidos de germinação de sementes no meio MS em diferentes concentrações de thidiazuron. 3)- Induzir a rizogênese em brotações obtidas da germinação de sementes "in vitro", variando o pH do meio MS modificado, adicionado ou não de AIB. 4)- Avaliar a germinação de sementes "in vitro" quando retirados ou não o tegumento das semente e sob 16/8 horas luz escuro ou 24 horas escuro. 5)- Avaliar a germinação de sementes "in vitro" no meio MS em diferentes percentagens de sacarose. 6)- Avaliar o desenvolvimentos de sementes nos meios MS e WPM em diferentes concentrações de TDZ. 7)- E comparar estruturas das folhas, caule e raízes em plantas obtidas de sementes cultivadas "in vivo" (casa de vegetação) com aquelas micropropagadas.



FIGURA 1-1- A- Aspectos gerais da planta de mama-cadela coletadas do campo e B- detalhe do sistema radicular.

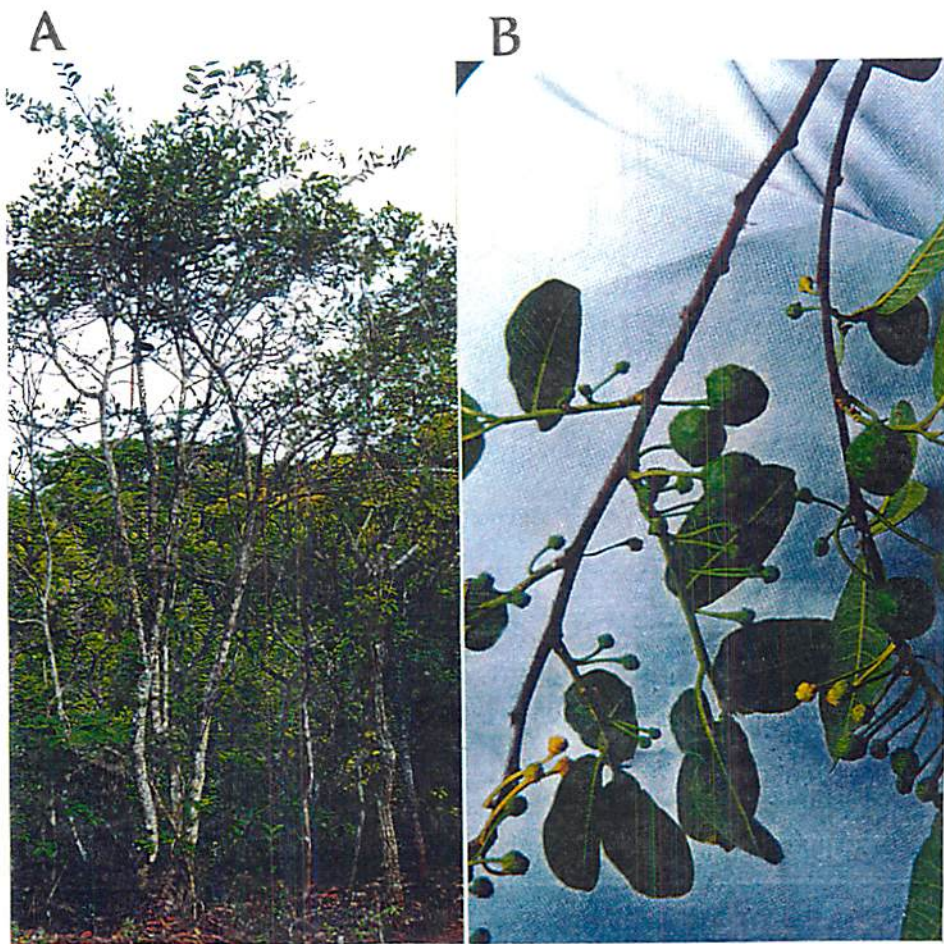


FIGURA 1-2- A- Aspecto geral da planta de *B. gaudichaudii* no campo
B- detalhe dos frutos.

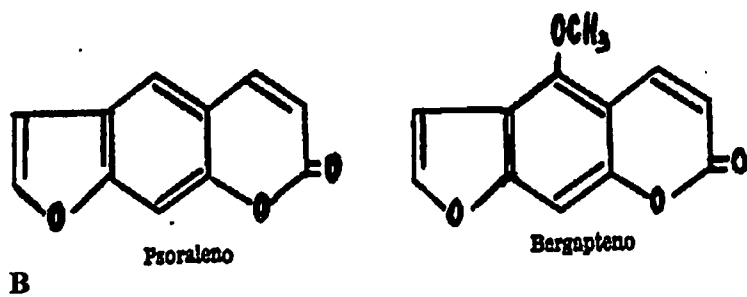
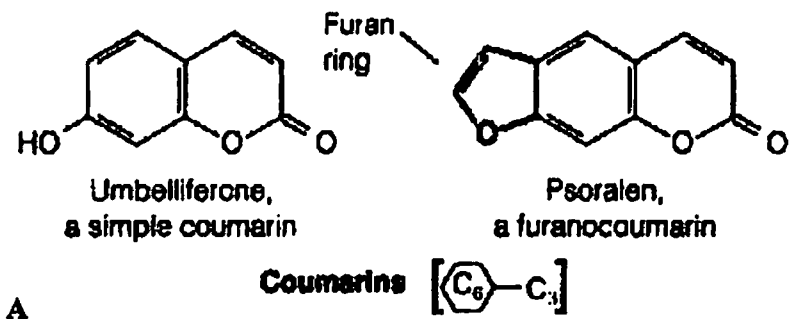


FIGURA 1-3-A-Estrutura de cumarina e furanocumarina e em B- as furanocumarinas psoraleno e bergapteno.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer, 1986. 2v.
- BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A. Natural plant chemicals: Source of industrial and medicinal material. **Science**, London, v.228, n.4704, p.1154-1160, June, 1985.
- BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A. Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. In: BAJAJ, Y.P.S.(ed) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin: v.4, p.3-36, 1988.
- BALBACHAS, A. **As plantas curam**. São Paulo: Miniomária, 1961. 438p.
- BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1978. 4v.
- CARLINI, E. Pesquisa com plantas medicinais usadas na medicina popular. **Revista Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.29, n.5/6, p.109-110, 1983.
- CASTRO, L.O.; CHEMALE, V.M. **Plantas medicinais- Condimentares e aromáticas (Descrição e cultivo)** Guaíba: Agropecuária, 1995, 196p.
- CORREA, J.R, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**, Curitiba: Emater-PR, 1991. 162p.
- CRAKER, L.E.; CHADWICK. A.F.; SIMON. J.E. Na introduction to the scientific literature on herbs, species, and medicinal plant. In: CRAKER, L.E. ; SIMON, J.E, (Coord.) **Herbs, species, and plants: Recent advances in botany, horticulture, and pharmacology**. Phoenix: Oryx Press, 1986. v.1, p. 1-5.
- CURTIN, M.E. Harvesting profitable products from tissue culture. **Bio/Technology**, New York, v.1, p.649-657, 1983.
- ELISABETSKY, E. Pesquisas em plantas medicinais. **Ciência e cultura**, São Paulo, v.39, n. 8 p. 697-702, Ago. 1987.

- FARNSWORTH, N.R. How can the well be dry when it is filled with water? **Economic Botany**, Lancaster, v.38, p.4-13, 1984.
- FARNSWORTH, N.R.; SOERJARTO, D.D. Potencial consequences of Plant extinction in United States on the current and future availability of prescriptions drugs. **Economical Botanical**, Lancaster, v.39, n.3, p.231-240, 1985.
- GIAGOMETTS, D.C. **Ervas condimentares e especiarias**, São Paulo: Nobel, 1989. 158p.
- GOTTLIEB, O.R.; MORS, W.B. Potencial utilization on brasilian wood extractives. **Journal of Agricultural and Food Chemical**, London, v.28, n.2, p.196-215, Mar./Apr. 1980.
- HERTWIG, I.F.G. **Plantas aromáticas e medicinais**, São Paulo: Ícone, 1986. 449p.
- LOYD, B.F.; JACKSON. M. Vegetables industrial crops, medicinal and forage plants. In: **Plant genetic resouces: na introduction to their conservation and use**. London: Edward Arnold, 1986. P.108-115.
- MADUEÑO-BOX, M. **Cultivo de plantas medicinais**, Madri: Labor, 1973. 490p.
- MARTINS, E.R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: Universidade Federal Viçosa, 1994. 220p.
- OLIVEIRA, F.; LUCIA, M.; GARCIA, L.O. Caracterização farmacológica da droga e do extrato fluído de menbrasto - *Ageratum conyzoides* L. **Lecta**, Bragança Paulista, v.11, n.1, p.63-100, Jan./Dez. 1993.
- PEARCE, S.E.M. In manipulating secondary metabolism in culture. In: ROBINS, R. J.; RHODES, M. J. C. **Secondary Products from Plant Tissue Culture**. Cambridge: University Press, 1988. P.155.
- REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Springer, 1977.
- SERTIÉ, J. CEME avalia uso de plantas como medicamentos. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 2 fev.1997. P.A23.

SILVA, O.F. Plantas brasileiras, pesquisas e patentes. Gazeta Mercantil São Paulo, 11set.1997. P.A2.

TYLER, V.E. Medicinal plant research; 1953-1987. Planta Medica, Stuttgart, v.54, n.2, p.95-100, 1988.

WOOD, B.V.; RHODES, M.J.C. Secondary products from plant tissue culture. New York: Oxford University Press, 1990. 279p.

CAPITULO II

ESTABELECIMENTO "IN VITRO" COM SEGMENTOS NODAIS

1- RESUMO

FIDELIS, Iraci. Estabelecimento "in vitro" de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. Com Segmentos Nodais. Lavras: UFLA, 1998. 109p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia)*

Plantas foram regeneradas a partir de segmentos nodais obtidos de "seedlings" de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae) "in vitro". Primeiramente foi avaliado o número de segmentos nodais obtidos de três repicagens na mesma semente em meio de cultura MS. Em um segundo trabalho segmentos nodais foram cultivados em meio MS suplementado com TDZ (0, 1, 2 e 3 mg/L) para indução de brotações ou calos. Em um terceiro trabalho os segmentos nodais foram induzidos a rizogênese em meio líquido com 1/4 dos sais do MS, variando o pH da solução (3,5; 4,5; 5,5 e 6,5), suplementado ou não com 1,0 mg/L de AIB. Após 3 repicagens, num período de 88 dias, foi obtida uma taxa de multiplicação de 3,54 segmentos nodais. Não foram registradas diferenças significativas na regeneração entre os diferentes tratamentos com TDZ. Os segmentos nodais mostraram-se melhor enraizamento com o pH mais ácido e suplementado com AIB.

Comitê Orientador: José Eduardo B.P. Pinto - UFLA (Orientador), Evaristo Mauro de Castro - UFLA, Manuel Losada Gavilanes - UFLA

2- ABSTRACT

FIDELIS, Iraci. "In vitro" establishment of *Brosimum gaudichaudii* Tréc. with nodal segments. Lavras: UFLA, 1998. 109p. (Dissertation - Masters degree in Agronomy, area of)*

Plant regeneration from nodal segments were obtained from seedlings of *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae) cultured "in vitro". Firstly, nodal segments number obtained from three subcultures in the some seed cultured in MS medium was evaluated. In a second work nodal segments were cultured in MS medium supplemented with TDZ (0, 1, 2 and 3 mg/L) to induce shoots or callus. In a third trial nodal segments were induced to rooting in liquid medium with 1/4 strength of the salts from MS, changing the pH of medium (3,5; 4,5; 5,5 and 6,5) supplemented or not with 1,0 mg/L IBA. After three subculture 88 days, an average of 3,54 nodal segments was obtained. There were not significant differences in regeneration between treatments in media supplemented with different amounts of TDZ. The nodal segments showed better rooting with pH more acid and supplemented with IBA.

3- INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma fonte rica de germoplasma de plantas com potencial medicinal seu uso também se aplica na indústria de inseticidas, corantes naturais e aromatizantes. *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae) é uma importante planta considerada medicinal nativa dos cerrados brasileiros. Conhecida popularmente como mama-cadela, esta espécie é utilizada principalmente no tratamento de vitiligo, entretanto, vem sendo explorada de forma predatória. A propagação vegetativa através da técnica de micropropagação "in vitro" permite

a multiplicação em larga escala de plantas elites, sendo assim, uma alternativa para a preservação da espécie.

Duas estratégias têm sido utilizadas para a micropropagação em plantas lenhosas: a regeneração de calos e a multiplicação de brotos (Einset, 1986b). Infelizmente, a regeneração de calos resulta em uma alta percentagem de variação somaclonal, tomando esta estratégia questionável para multiplicação clonal em larga escala de plantas medicinais lenhosas. A multiplicação de brotos, por outro lado, é um método seguro que pode ser usado quando a produção de clones de plantas medicinais lenhosas for requerida.

Em princípio, a micropropagação de brotos explora o efeito da relação auxina/citocinina na regulação do crescimento "in vitro" (Skoog e Miller, 1957).

Thidiazuron é uma nova citocinina que tem sido utilizada na micropropagação (Thomas e Katterman, 1986; Bolyard, Srinivasan e Cheng 1991). Porém, cuidado deve ser tomado com o uso de TDZ para a micropropagação clonal porque ele não apenas estimula a proliferação de brotos axilares, mas também de calos.

Uma das fases críticas da micropropagação é o enraizamento das plântulas "in vitro". O ácido indol butírico (AIB), dentro do grupo das auxinas, tem-se utilizado mais eficiente no enraizamento.

Leifert et al. (1992) mostraram que diferentes espécies de plantas [*Choisya* (Rutaceae), *Daphne* (Melaeaceae), *Dephinum* (Ranunculaceae), *Hemerocallis* (Liliaceae), *Hosta* (Nyrsinaceae), *Iris* (Iridaceae) e *Photma* (Rosaceae)] tinham requerimento distinto em relação ao pH para ótimo crescimento e taxa de enraizamento.

Na micropropagação, o meio MS, de Murashige e Skoog (1962), é o mais utilizado para a organogênese "in vitro". De modo geral, Lane (1978) sugere que as diluições da formulação básica do MS, de 50%, 66,66%, ou 75% são frequentemente utilizadas para o enraizamento.

O presente trabalho descreve o número de segmentos nodais que poderiam ser obtidos a partir da germinação de sementes "in vitro", o efeito do TDZ na formação de brotos axilares e segmentos nodais e o efeito do pH na presença ou não de AIB no enraizamento "in vitro" de segmentos nodais em meio MS líquido e diluído.

4- REFERENCIAL TEÓRICO

As plantas são propagadas através de dois ciclos de desenvolvimento: sexual ou assexual.

No ciclo sexual a nova planta surge através da fusão de gametas paterno e materno, desenvolvidos de embriões contidos dentro de sementes. Em muitos casos as plântulas serão diferentes entre si e cada uma representará uma nova combinação de genes, originado aproximadamente durante a formação dos gametas (divisão meiótica da célula).

No ciclo vegetativo (assexual) a característica única de uma referida planta em particular selecionada para a propagação é usualmente perpetuada. Isto se deve o fato de que durante a divisão celular normal (mitose), os genes são tipicamente copiados exatamente a cada divisão. Em muitos casos, cada nova planta obtida por este método pode ser considerada uma extensão da linha de células somáticas de um indivíduo. Um grupo de plantas de tal reprodução assexual é denominado um clone. Os métodos que teoricamente capacitam a propagação "in vitro" são essencialmente: pela multiplicação de brotos através de brotos axilares e pela formação de brotos adventícios ou embriões somáticos adventícios. Estes brotos podem ser produzidos diretamente através de segmentos nodais e indiretamente através de células desorganizadas (em cultura de suspensão) ou tecidos (em cultura de calos) estabelecida pela proliferação de células dentro de explantes; ou de tecidos semi-organizados ou propagados por

massa (tal como um protocorms ou pseudo-bulbilhos) que podem ser obtidos de um explante.

Murashige (1974) definiu 3 etapas para a multiplicação de plantas "in vitro". Estas etapas têm sido largamente adotados por laboratórios de cultura de tecidos tanto na área de pesquisa como na área comercial.

Etapa I - Iniciação da cultura - crescimento de pedaços de tecidos ou órgãos "in vitro" livre de algas, bactérias, fungos e outros contaminantes.

Etapa II - Aumento dos propágulos - indução da cultura para a produção de um número de brotos e embriões.

Etapa III - Preparação de transferência para o solo - separação e preparação do explante para ter uma alta taxa de sobrevivência como plantas individualizadas no ambiente externo.

Antes da etapa I, cuidadosa atenção deve ser dada à seleção da planta matriz; como: selecionar a espécie, fazer tratamento nutricionais, pulverizar com fungicidas e diminuir a irrigação na época da retirada do explantes para a inoculação. Este passo inicial pode reduzir o nível de contaminação do explante e é considerado importante por Debergh e Maene (1981), sendo um estágio separado e essencial em um programa de micropropagação comercial.

Micropropagação é uma importante tecnologia para a multiplicação de diversas espécies de plantas lenhosas.

Duas estratégias básicas tem sido utilizada para a micropropagação em plantas lenhosas: a regeneração de calos e a multiplicação de brotos (Einset 1986). Infelizmente, a regeneração de calos frequentemente resulta em uma alta percentagem de variação somaclonal, tornando esta estratégia questionável para multiplicação clonal em larga escala de planta medicinais lenhosas superiores. A multiplicação de brotos (segmentos nodais), por outro lado, é um método seguro que pode ser usado quando a produção de largo número de clones de plantas medicinais lenhosas for requerida.

Em princípio, a micropropagação de brotos explora o efeito da relação auxina/citocinina (Figuras 2-1- A e B) na regulação do crescimento de brotos debaixo de condições controladas "in vitro" (Skoog e Miller 1957).

Entre as novas citocininas, destaca-se o thidiazuron utilizado na micropropagação para indução de brotações, especialmente para espécies lenhosas.

Thidiazuron (N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea) foi registrado em 1976 como um desfolhante de algodão (Arndt, Rusch e Stilfried, 1976).

A molécula é um derivado da uréia e não contém o anel purina, comum às citocininas tipo adenina, bem como benzilaminopurina, cinetina e zeatina. Em 1992, o TDZ foi relatado por ter alta atividade na promoção do crescimento de cultura de calos de *Phaseolus lunatus* (L.) cv. Kingston (Leguminosae-Papilionoideae) (Mok et al., 1982). Este composto não apenas promove o crescimento de tecidos de calos, como também aumenta a atividade citocinina que foi mais alta que diversas citocininas testadas, inclusive zeatina (Mok, Mok e Turner, 1987). A capacidade desta molécula em estimular a divisão celular também tem sido demonstrado em calos de soja (Thomas e Katterman, 1986). Independentemente de estimular a divisão celular, o TDZ também induz a formação de brotações axilares em pedaços de folhas de tabaco e estimula a expansão dos cotilédones de rabanete (Thomas e Katterman, 1986). Desde 1988, estudos mostram que o TDZ induz a formação de brotos adventícios em um número de espécies, especialmente plantas lenhosas (Tabela 2-1).

TABELA 2-1 Sumário da indução de thidiazuron na regeneração de brotos adventícios

Espécies	Explantos	Meio básico	Referência
<i>Celtis occidentalis</i> L. (Ulmaceae)	Broto apicais	MS modificado	Meyer e Kerns, 1986
<i>Picea glauca</i> Hort. Ex Beissn. (Coniferae)	Embrião	WPM e 1/2 SH	Ellis, Barczynska e McCown, 1991
<i>Prunus cerasus</i> Scop. (Rosaceae)	Cotilédones	MS	Mante, Scorza e Cordis, 1989
<i>Pyrus communis</i> L. (Rosaceae)	Folhas	1/2 MS	Chevreau, Skirvin e Abu- Uaoud, 1989
<i>Rubus spp.</i> (Rosaceae)	Cotilédones	MS	Fiola, Hassanm e Swartz, 1990
<i>Ulmus americana</i> L. (Urticaceae)	Folhas	MS modificado	Bolyard, Srinivasan e Cheng, 1991

Explantos de algumas espécies lenhosas (especialmente árvores) têm um forte e natural hábito de crescimento "in vitro" no qual a gema terminal é persistente (ramificação monopodial) e não ramifica (ou seja não produz brotações axilares e adventícias) suficientemente quando usamos citocininas mais comuns como aminopurina. O uso de TDZ oferece uma alternativa que freqüentemente aumenta a produção de brotos destas espécies (TABELA 2-2).

TABELA 2-2 Referência na qual o TDZ foi usado para proliferação de brotos axilares.

Espécies	Explantos	TDZ (μM)	Referência:
<i>Acer rubrum</i> L. (Aceraceae)	Brotos apicais	0,01-0,05	Kerns e Meyer 1985 (Abstr)
<i>A. saccharinum</i> L. (Aceraceae)	Nó singular	$0,1 \times 10^{-3}$ -10	Preece et al., 1991a
<i>Juglans nigra</i> L. (Juglandaceae)	Embrião	0,1	Preece et al., 1987 (Abstr)
<i>Pyrus communis</i> L. (Rosaceae)	Brotos apicais	0,1-0,8	Singha e Bhatia 1988 (Abstr)
<i>Quercus robur</i> Pall. (Fagaceae)	Brotos apicais	0,0045-0,45	Chalupa 1988
<i>Tilia cordata</i> Mill. (Tiliaceae)	Brotos apicais	0,005-0,1	Chalupa 1988
<i>Vitis vinifera</i> L. (Vitaceae)	Segmento nodal	0,001-10	Gribaudo e Fronda 1991

Entretanto, cuidados devem ser tomados com o uso de TDZ para a micropropagação clonal, porque ele não apenas estimula a proliferação de brotos axilares, mas também a formação de calos.

Comparando a muitos outros compostos ativos adicionados ao meio, o TDZ estimula a proliferação de brotos axilares em muitas espécies lenhosas à concentrações extremamente baixas.

Thidiazuron é uma potente citocinina que provoca a formação de calos em espécies lenhosas, especialmente quando usado a uma concentração igual ou maior que 0,1 μM .

A produção de calos é quase sempre um passo essencial na regeneração de órgãos adventícios. A alta concentração de TDZ tende a estimular a formação

de calos em muitas espécies lenhosas, não raro às custas da proliferação de brotos axilares.

Thidiazuron é resistente à degradação por citocinina oxidase (Mok, Mok e Turner, 1987). Assim, ele é bastante estável em cultura de tecido. TDZ é mais ativo biologicamente que BAP e zeatina. Uma concentração mais baixa é necessária em cultura de tecido, principalmente durante a micropropagação. TDZ é tão ou mais efetivo em muitas espécies nas quais tem sido testado; especialmente em espécies lenhosas.

Em certas espécies, experiências mostram algumas desvantagens quanto ao uso do TDZ por causar desordem morfo-anatômica, dificultando a regeneração de brotos (Briggs, McCulloch e Edick, 1988). Preece e Imel (1991) relatam que a maioria dos brotos regenerados em meio com TDZ estavam curtos, mas alongaram depois de transferidos para um meio contendo ácido indolbutírico e 2iP.

As auxinas, muito utilizadas na micropropagação, além da relação que mantêm com as citocininas, são comumente utilizadas na indução da rizogênese. Elas causam um aumento na extensibilidade (afrouxamento) da parede celular em coleótilo e caules jovens em desenvolvimento. Auxinas não se ligam diretamente à parede celular, mas atuam na membrana plasmática ou dentro da célula. Deste modo, em resposta a auxinas, as células da planta devem exportar algum fator de afrouxamento da parede celular que promove a extensibilidade da parede. Um destes fatores de afrouxamento é o íon hidrogênio (H^+). O íon hidrogênio pode atuar como um intermediário entre a auxina e o afrouxamento da parede celular; e foi primeiro demonstrado por Rayle e Cleland (1970). Os resultados conduziram à teoria do crescimento ácido o qual a auxina estimula o alongamento da célula da planta (Rayle e Cleland, 1977). De acordo com esta teoria, a auxina causa uma resposta à célula para exportar prótons ativamente dentro da região da parede celular. O resultando é um decréscimo no pH, que

ativa enzimas as quais causam o afrouxamento da parede celular, aumentando a extensibilidade da parede.

O pH do meio, outro fator que tem um grande efeito na micropropagação, é alterado durante o cultivo, mas um pH inicial pode ser selecionado para capacitar a utilidade dos nutrientes e para uma taxa mais rápida de crescimento da cultura. No meio de cultura, efeitos do pH são geralmente relacionados à disponibilidade de íons e nutrientes considerados antes das células serem danificadas.

Íons amônio e nitrato são marcadamente afetados pelo pH. Raízes cortadas de plantas podem ser crescidas com $(\text{NH}_4)^+$ como única fonte de nitrogênio, contanto que o pH do meio esteja dentro do limite de 6,8 a 7,2 e o ferro disponível na forma de quelato. A um pH abaixo de 6,4, as raízes crescem vagarosamente em um meio com apenas $(\text{NH}_4)^+$ como fonte de nitrogênio e têm uma aparência anormal (Sheat, Fletcher e Street, 1959). Isto está de acordo com experimentos em que plantas intactas, fornecendo apenas amônio como fonte de nitrogênio, este foi pobremente absorvido a um pH baixo (Sheat, Fletcher e Street, 1959).

Uma das principais vantagens de ter ambos os íons $(\text{NO}_3)^-$ e $(\text{NH}_4)^+$ no meio de cultura é que um supre o outro a um pH do meio considerado. Considerando o íon nitrato, as células das plantas conduzem o meio para um pH alcalino, enquanto $(\text{NH}_4)^+$ resulta em uma mais rápida acidificação do meio (Hyndman, Hasegawa e Bressn, 1982). Para cada equivalente íon amônio incorporado dentro da célula, aproximadamente 0,8 a 1,0 H^+ (próton), equivalentes é liberados dentro do meio de cultura; para cada equivalente íon nitrato incorporado dentro da células, de 1 a 1,2 próton, equivalentes é removidos do meio (Fuggi et al., 1981). Raven (1986) calculou que não deveria ser alterado o pH resultante de $(\text{NO}_3)^-$ ou $(\text{NH}_4)^+$, quando a relação dos dois íons fossem 2 para 1.

A disponibilidade de outros íons inorgânicos e moléculas orgânicas é também afetada pelo pH. O fósforo é absorvido com mais eficiência em uma solução ácida. Células de *Petunia* consumiram fosfato mais rápido a um pH 4 e declinou o consumo quando o pH foi aumentado (Chin e Miller, 1982). Vacin e Went (1949) notaram a formação de complexos fosfatos de ferro no meio pela mudança no pH.

Lisina em cultura de células de tabaco foi encontrada por Harrington e Henke (1981) ser estimulado por baixo pH.

Autoclavagem muda o pH do meio. Em meio sem açúcar, a mudança é quase pequena. Um meio autoclavado com sacarose geralmente tem um menor pH que aquele autoclavado sem sacarose (Owen, Wengerd e Miller, 1991).

Devido a diferença de ânion e cátion dentro do tecido das plantas, o pH do meio de cultura não fica ordinariamente constante, mas muda com os íons e compostos absorvidos pela planta. Sugere-se que a acidificação do meio é em parte devida à acumulação do dióxido de carbono em cultivo em frasco hermeticamente fechado (Leva, Barroso e Murillo, 1984).

Outro fator físico que frequentemente inibe a rizogênese "in vitro" é a luz. Em poucos trabalhos, nota-se o efeito benéfico do escuro durante a primeira fase do processo de enraizamento. Hammerschlag, Bauchan e Scorza (1987), trabalhando com árvores de maçã, combinaram a temperatura de 26 °C e um período de 14 dias de escuro. Na comparação do enraizamento de dois clones de cereja, Druart et al. (1981) provou a eficiência do tratamento de escuro por 10 dias: A percentagem de enraizamento subiu de 53,6 para 84,3%. O efeito positivo do escuro é algumas vezes enfatizado pelo aumento da temperatura ou pela adição de floroglucinal no meio (Zimmerman and Fordham 1985).

Relatos comprovam que o meio contendo menos ágar é mais favorável à rizogênese, propiciando a retomada das condições normais de crescimento e afetando também a vitrificação (Von Arnold and Eriksson 1984). O suporte do

meio de cultura exerce importante papel no processo de enraizamento e na sucessiva aclimatização. O efeito do agar foi analisado por Nemeth (1986); a redução do oxigênio, devido aos colóides, pode diminuir o enraizamento (Gebhardt and Friedrich 1987).

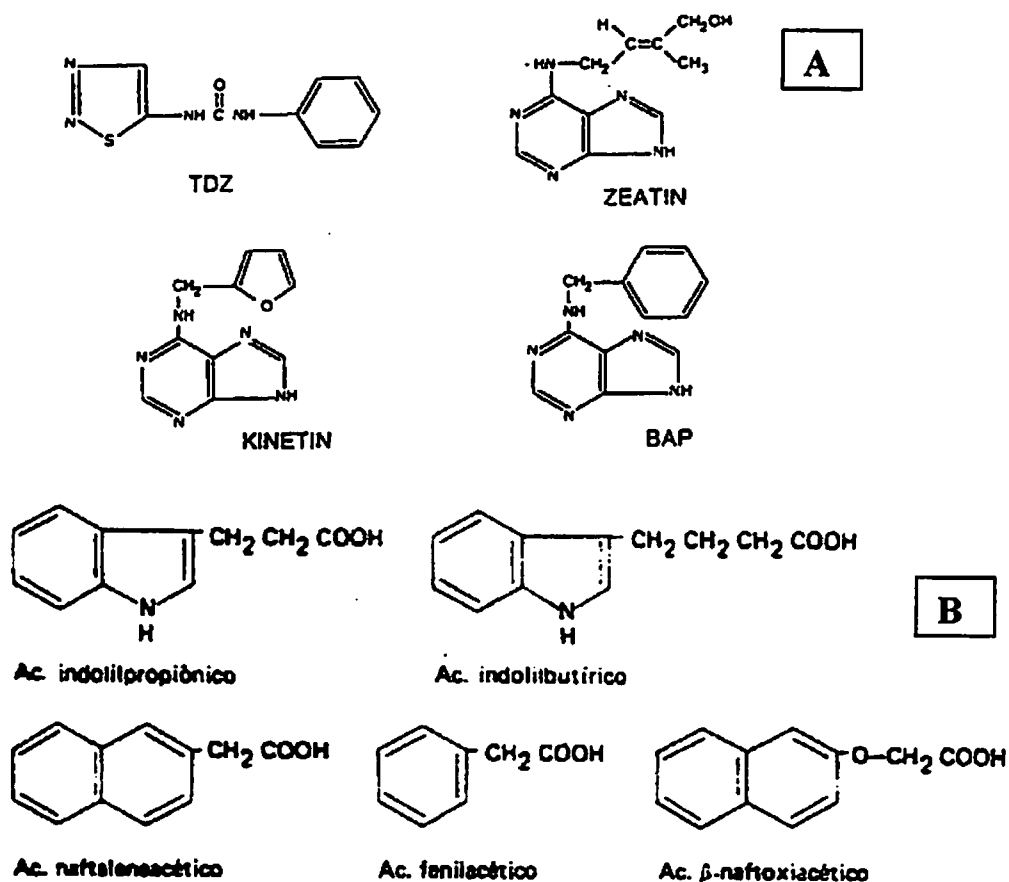


FIGURA 2-1 Estrutura de citocininas e auxinas. A- thidiazuron, zeatina, cimetina e benzilaminopurina e B- ácido indol-3-propiónico, ácido indol-3-butírico, ácido naftalenoacético ácido fenilacético e ácido β natoxiacético.

5- MATERIAIS E MÉTODOS

Como fonte de explante para o cultivo "in vitro", foram utilizadas sementes imaturas de mama-cadela cultivadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os frutos verdes foram desinfestados em solução comercial, contendo 2% de hipoclorito de sódio, ajustado para um pH 5,5 por 10 minutos, sob agitação. Após os frutos serem lavados quatro vezes em água autoclavada em câmara de fluxo laminar, foram retiradas as sementes imaturas dos mesmos e cultivadas para germinação.

As sementes (experimento 1), bem como os segmentos nodais (experimentos 2 e 3) foram colocados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) com 20 ml de meio de cultura por tubo. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob condições ambientais controladas, tais como, fotoperíodo de 16 h luz e 8 h de escuro, temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ mantidas por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria e avaliados aos 35, 62 e 88 dias experimento 1 e aos 60 dias experimentos 2 e 3.

5.1 EXPERIMENTO 1 ESTABELECIMENTO "IN VITRO"

Sementes foram inoculadas em meio de cultura Murashige e Skoog (1962)-MS completo. Após a germinação, fez-se uma repicagem dos segmentos nodais com um tamanho médio de 4,4 cm aos 35 dias. As sementes permaneceram no frasco com uma gema nas plântulas germinadas e repicadas. Aos 62 dias, repicaram-se novamente os segmentos nodais que haviam crescidos, colocando 5 ml de meio MS em cada tubo de ensaio. Aos 88 dias, fez-se uma última repicagem, obtendo desta forma um número de segmentos nodais (clones) de uma mesma semente.

5.2 EXPERIMENTO 2 MULTIPLICAÇÃO DE SEGMENTO NODAL

Para multiplicação dos segmentos nodais, foram utilizados como explante primário sementes germinadas "in vitro". Os segmentos nodais tinham em média um tamanho de 13 mm com 1 a 2 gemas em média. O meio utilizado foi o Murashige e Skoog (1962)-MS completo, suplementado com thidiazuron (TDZ) nas seguintes concentrações: 0, 1, 2, e 3 mg/L. Aos 60 dias, foram avaliados o número de brotos e tamanho de brotos. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 tratamentos (0, 1, 2 e 3 mg/L de TDZ) e 4 repetições, sendo cada parcela constituída por 4 tubos de ensaio e um segmento nodal por tubo.

5.3 EXPERIMENTO 3 ENRAIZAMENTO DE SEGMENTO NODAL

Na fase de enraizamento foram utilizados segmentos nodais de 13 mm de comprimento com 1 a 2 gemas em média. O meio de cultura utilizado foi 1/4 dos sais do Murashige e Skoog (1962)-MS, em solução líquida e suplementado com ácido indol butírico (AIB) na concentração de 0 e 1 mg/L, variando o pH da solução em 3,5; 4,5; 5,5 e 6,5.

O delineamento empregado foi o inteiramente casualizado com 8 tratamentos, (pH de 3,5; 4,5; 5,5 e 6,5) com ou sem (1,0 mg/L de AIB), sendo 4 tubos de ensaio por repetição. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se os níveis de significância de 5% para o teste F. Para efeitos de análise estatística, os dados foram transformados para raiz de $(x+1)$.

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ESTABELECIMENTO "IN VITRO"

A repicagem (três, aos 35, 62 e 88 dias) sucessiva, proveniente das brotações da semente de mama-cadela, mostrou ser viável para obtenção de plântulas "in vitro" (Figura 2-2). Os resultados de três repicagens encontram-se representados na Tabela 2-3.

TABELA 2-3 Tamanho (Tam.) (cm) e número de gemas (N.G) obtidos em três repicagens feitas na mesma semente cultivada "in vitro".

PRIMEIRA REPICAGEM		SEGUNDA REPICAGEM		TERCEIRA REPICAGEM	
Tam	N.G	Tam	N.G	Tam	N.G
1,5	2	2,0	2	1,5	1
2,0	2	2,0	1	1,5	1
1,5	1	0,5	1	0,9	1
1,5	3				
1,5	1				

Aos 35 dias (primeira repicagem) foram obtidos 5 segmentos nodais com um tamanho médio de 1,6 cm e com 1,8 gemas. Na segunda repicagem (62 dias) da mesma semente foram obtidos 3 segmentos nodais com um tamanho médio de 1,5 cm 1,3 gemas e na terceira (88 dias) a semente produziu mais 3 segmentos nodais com 1,3 cm contendo 1 gema em média.

Após 110 dias da inoculação, fez-se uma avaliação total das 11 brotações (segmentos nodais) obtidas desta semente e as mesmas estavam em média com 3,5 cm de tamanho contendo 3,5 gemas por segmento nodal.

[REDACTED]

Estes resultados, obtidos com mama-cadela, são semelhantes aos observados por Scott, Rao e Loh (1995) em *Hopea odorata* Roxb.(Dipterocarpaceae), espécie recalcitrante, da qual foram produzidos em média de 1 a 4 brotos axilares da mesma semente cultivada nos meios MS e B₅, não havendo diferenças quanto ao meio utilizado.



FIGURA 2-2 Segmentos nodais obtidos a partir da germinação de sementes "in vitro" no meio Murashige e Skoog 1962.

6.2 MULTIPLICAÇÃO DE SEGMENTO NODAL

O cultivo "in vitro" de segmentos nodais obtidos a partir de sementes para a proliferação de brotações axilares e/ou adventícias no meio MS com 4 concentrações de TDZ (0, 1, 2 e 3 mg/L) apresentaram diferenças significativas representadas na Tabela 2-4.

TABELA 2-4 - Resumo da análise de variância (quadrados médio e significância) para segmentos nodais de mama-cadela cultivados em meio MS com quatro concentrações de TDZ (0,0 1,0 2,0 e 3,0 mg/L) e avaliados aos 60 dias. UFLA.LAVRAS/MG 98.

Causas variação	G.L.	Números brotos	Tamanho brotos
TDZ	3	0,2213 ^{ns}	0,3727**
Erro	16	0,1144	0,0370
c.v.(%)		16,7	14,5
Média		2,02	1,32

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F.

^{ns} não significativo

Pela análise de variância (Tabela 2-4), verificamos diferenças significativas para TDZ ($P < 0,01$) e para o tamanho da parte aérea (T.P.A.) (brotos). O número de brotos formados não diferiram estatisticamente pelo teste F para as concentrações de TDZ; o menor número de brotações formadas quando se utilizou o TDZ foi devido ao acaso.

O efeito das doses de TDZ no número de brotações formadas estão representados na figura 2-4. No meio MS, sem a presença de TDZ (0,0 mg/L), havia formado em média 2,3 brotos por explante. Quando adicionamos TDZ ao meio, o número de brotos foram sendo reduzidos, caindo até atingir 1,8 brotações por explante na dose 3,0 mg/L de TDZ (Figuras 2-3).

O tamanho das brotações (T.P.A.) observou-se também uma inibição no tamanho das brotações devido à presença do TDZ (Fig. 2-4). O tamanho dos brotos, 1,7 cm no tratamento 0,0 de TDZ caiu para 1,1 cm na dose 2,0 mg/L de TDZ. Esta inibição representou uma redução de 54% no tamanho das brotações.

$$Y = 2,2524 - 0,1541x \quad R^2 = 0,8946^*$$

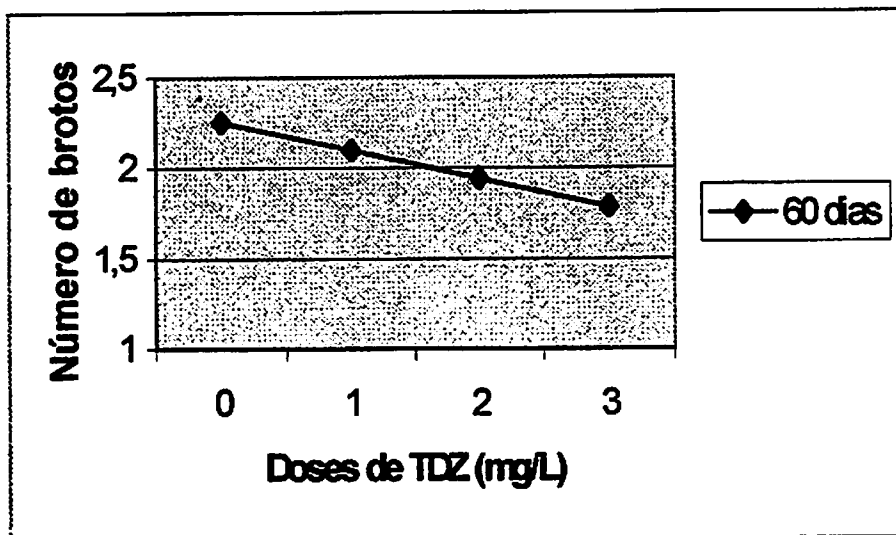


FIGURA 2-3 Valores médios para número de brotos e equação de regressão quando segmentos nodais foram inoculados em meio MS com 4 concentrações de TDZ.

$$Y = 1,7174 - 0,5511x + 0,1236 x^2 \quad R^2 = 0,9999^{**}$$

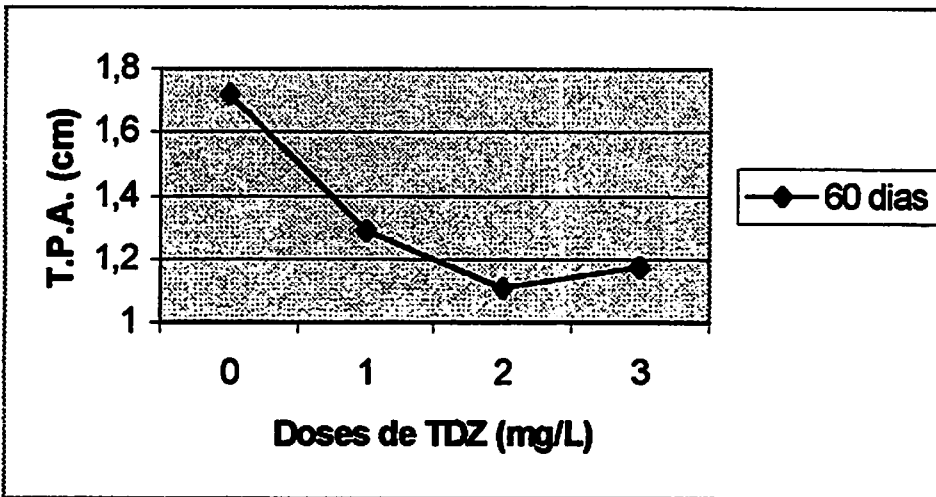


FIGURA 2-4 Valores médios para tamanho da parte aérea e equação de regressão quando segmentos nodais foram inoculados em meio MS com 4 concentrações de TDZ.

Kaneda et al. (1997), citam que induziram brotos adventícios diretamente de segmentos cotiledonares e de segmentos acima do hipocótilo, ambos com TDZ e BA. A taxa de formação de brotos foi influenciada por ambos os tipos de tecidos e pela citocinina escolhida. Eles conseguiram uma taxa de formação de brotos de segmentos de hipocótilos de 37% em regeneração no meio com TDZ e 30% no meio com BA. Formações múltiplas de brotos dos segmentos de hipocótilos cultivados em meio para regeneração, suplementados com TDZ, foram também induzidos mais eficientemente (23%) do que com BA (7%).

Já o cultivo "in vitro" de cotilédones e folhas de *Rubus*, segundo Fiola, Hassan e Swartz, 1990 e a regeneração de plantas a partir de cotilédones de *Prunus persica* Sieb. et Zucc.(Rosaceae), *Prunus domestica* L. (Rosaceae) e

Prunus cerasus L. (Rosaceae) segundo Maente, Scorza e Cordts foi mais efetivo com TDZ. Isto suporta a hipótese de que o TDZ tem uma forte atividade citocinina e baixas concentrações na indução da organogênese em espécies lenhosas.

A alta atividade citocinínica do TDZ pode ter sido muito forte nas concentrações utilizadas para a espécie *Brosimum guadichaudii* Tréc., pois com 1 mg/L já estava ocorrendo uma diminuição significativa no número e tamanho das brotações formadas.

6.3 ENRAIZAMENTO DE SEGMENTO NODAL

Segmentos nodais de mama-cadela cultivadas no meio MS líquido (1/4 dos sais), com pH anteriormente ajustado entre os valores 3,5; 4,5; 5,5 e 6,5 adicionados ou não com 1,0 mg/L de AIB apresentaram diferenças significativas, que encontram-se resumidas na Tabela 2-5 abaixo.

TABELA 2-5 Resumo da análise de variância (quadrado médio e significância) para número e tamanho de raízes e tamanho de brotos, quando segmentos nodais de mama-cadela foram cultivados in vitro no meio MS líquido (1/4 dos sais) em quatro níveis de pH, na presença ou não de AIB. UFLA.LAVRAS/MG 98.

Causas de variação	G. L	Número raízes	Tamanho raízes	Tamanho Brotos
PH	3	0,0901 ^{NS}	0,5791*	0,0376 ^{NS}
AIB	1	0,1138 ^{NS}	0,5607*	0,2663*
pH x AIB	3	0,0767*	0,4508 ^{NS}	0,0415 ^{NS}
Erro	16	0,0300	0,1520	0,0578
c.v.%		15,8	32,6	18,2
Média		1,20	1,19	1,32

* significativo a 5% pelo teste F, ^{NS} não significativo

Pela análise de variância (Tabela 2-5) verifica-se que há diferenças significativas para pH ($P < 0,05$), para tamanho raízes e AIB ($P < 0,05$) para tamanho de brotações e de raízes. Não houve efeito interativo entre pH e AIB em nenhum dos parâmetros avaliados, (número de raízes, tamanho de raízes e tamanho de brotações).

Observou-se que não havia diferença significativa entre os tratamentos quanto ao número de raízes formadas. Já o tamanho das raízes era de 1,48 cm no pH 3,5 caindo nos demais pH até atingir o tamanho de 0,9 cm no pH 6,5. Esta redução no tamanho das raízes representou 38% a menos no tamanho de raízes no pH 6,5 em relação ao pH 3,5, Figura 2-5. O tamanho das brotações só foi afetado pela presença da AIB, sendo que na sua presença houve uma redução de 54% (dados não apresentados).

$$D: y = 2,1321 - 0,1875x \quad R^2 = 0,6072^{**}$$

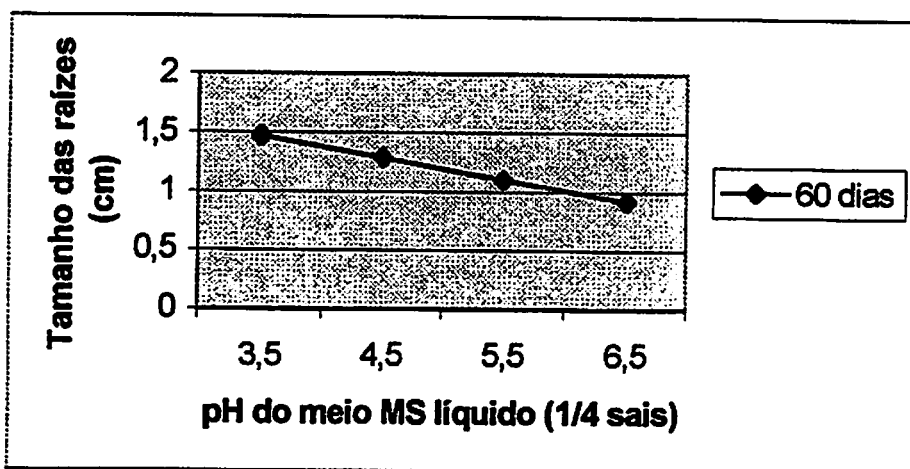


Figura 2-5 Valores médios para tamanho das raízes e equação de regressão quando segmentos nodais de mama-cadela foram cultivadas no meio MS líquido (1/4 sais) em vários níveis de pH na presença de 1 mg/L de AIB.

Arellano, Pinto e Blank (1977), estudando a concentração de auxina no enraizamento, observaram que o AIB interagiu com o tamanho inicial da brotação no que diz respeito à formação de raízes e ao comprimento. Estes resultados estão de acordo com os encontrados no presente experimento, uma vez que o AIB e o pH afetaram o tamanho das raízes, só não sendo significativo sua interação. O meio em que tinha AIB formou mais raízes no pH 3,5 decrescendo linearmente seu tamanho à medida que aumentava o pH.

O enraizamento "in vitro" é sempre um fase crítica no processo de propagação de plantas lenhosas. Scott et al. (1988) justifica assim o uso do meio líquido em algumas espécies lenhosas como a *Shorea roxburghii* G.Don (Dipterocarpaceae), na qual poderia aumentar a formação de raízes. Com a mama-cadela observamos que o meio líquido foi favorável ao enraizamento "in vitro".

Dos fitoreguladores, destaca-se o AIB que tem sido a auxina mais utilizada na indução da rizogênese "in vitro", principalmente em espécies lenhosas. Sriskadarajah, Mullins e Nair (1982), relatam que conseguiram o enraizamento de uma cultivar de maçã, de difícil enraizamento, apenas com tratamento à base de 10 μ M de AIB.

Enquanto Pinto et al., (1996), relata que a indução da rizogênese "in vitro" em brotações micropropagadas de *Kielmeyera coriacea* (Spr.) Mart. (Clusiaceae) só ocorreu em meio com a formulação salina original de Murashige e Skoog (1962) solidificado com 3,0 ou 6,0 g/L de ágar, diferente do encontrado para mama-cadela.

No presente, em segmentos nodais de mama-cadela, constatou-se que apenas no tratamento com AIB (1,0 mg/L) no meio MS líquido (1/4 dos sais) com o pH do meio de cultura de 3,5, houve uma resposta no tamanho das raízes formadas. Este tratamento formou em média 65% a mais de raízes do que em pH(6,5) Figura 2-6.



FIGURA 2-6 Efeito do pH (3,5) no meio MS líquido (1/4 sais) e AIB (1,0 mg/L) no enraizamento de segmentos nodais de mama-cadela , aos 30 dias.

7- CONCLUSÕES

Múltiplos segmentos nodais (brotações) são possíveis de serem obtidos a partir de uma única semente germinada "in vitro" e submetida a repetido ciclo de germinação-repicagem, mantendo uma gema a cada repicagem no segmento nodal que permanece na semente.

O TDZ na indução de brotações adventícias ou axilares em segmentos nodais não promoveu o aumento do número de brotações. Observamos apenas uma redução no tamanho das brotações à medida que aumentava as concentrações de TDZ no meio. Aos 60 dias, não sendo esta diferença

estatisticamente significativa, o número de gemas caiu de 4,3 para 2,2 e o tamanho da brotações de 1,9 para 0,2 respectivamente quando a concentração de TDZ variou entre 0,0 para 3,0 mg/L.

A indução da rizogênese em segmentos nodais de mama-cadela ocorreu em meio MS 1/4 dos sais sem a adição de agente solidificante, com o pH da solução previamente ajustado para 3,5 e com 1,0 mg/L de AIB. Neste tratamento, formaram-se raízes que diferiram apenas quanto ao tamanho; (64%) superior ao meio com pH 6,5.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNDT, F.R.; RUSCH, R.; STILLFRIED, H.V.; HANISCH, B.; MARTIN, W.C. SN 49537, A new cotton defoliant. *Plant Physiology*, Washington, v.57, p. 99; 1976.
- ARELLO, E.F.; PINTO, J.E.B.P.; BLANK, M.F.A. Influência do comprimento de microbrotações e concentração de auxina no enraizamento "in vitro" de *Kielmeyera coriacea* Mart. (Guttiferae), *Ciência e Agrotecnologia Lavras*, v.2, n.4, p.442-446, out/dez. 1997.
- BOLYARD, M.G.; SRINIVASAN, C.; CHENG, J.; Sticklenm M. Shoot regeneration from leaf explants of American and Chinese Elm. *HortScience*, Alexandria, v.26, n.12, p. 1554-1555; Dec. 1991.
- BRIGGS, B.A; McCULLOCH, S.M.; EDICK, L.A Micropropagation of azaleas using thidiazuron. *Acta Horticulture*, Leuven, v.226, p.205-208, 1988.
- CHALUPA, V. Large scale micropropagation of *Quercus robur* L.using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation. *Biology Planta*, Praha, v.30, p. 414-421, 1988.
- CHEVREAU, E.; SKIRVIN, R.M.; ABU-UAOUD, H.A., et al. Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (*Pyrus* sp.) cultivars in vitro. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.7, n.4, p.688-691, 1989.
- CHIN, C.K.; MILLER, D. Some characteristics of the phosphate uptake by *Petunia* cells. *HortScience*, Alexandria, v.17, n.3 p. 488, June 1982.

- DEBERGH, P.C.; MAENE, I.J. A scheme for the commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulture*, Amsterdam, v.14, p.335-345, 1981.
- DRUART, P.; BOXUS, P.; LIARD, O; DELAITE, B. La micropropagation du merisier à partir de la culture de méristème. Colloque international sur la culture "in vitro" des essences forestières. Fontainebleau: IUFRO 1981. p.101-108.
- EINSET, J.W. A practical guide to woody plant micropropagation. *Arnoldia*, Jamaica Plain, v.46, p.36-44, 1986.
- ELLIS, D.D.; BARCZYNSKA, H.; McCOWN, B.H., et al. A comparison fo BA, zeatin and thidiazuron for adventitious bud formation from *Picea glauca* embryos and epicotyl explants. *Plant Cell Tissue Organ Cultutre*, Dordrecht, v.27, n.3, p. 281-287, Dec. 1991.
- FIOLA, J.A.; HASSANM, M.A.; SWARTZ, H.J., et al. Effect of thidiazuron, light, fluence rates and kanamycin on in vitro shoot organogenesis from excised rubus cotyledons and leaves. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, Berlin, v.20, p. 223-228; 1990.
- FUGGLI, A.; RUGANO, V.M.; VONA, V.; RIGANO, C. Nitrate and ammonium assimilation in algae cell-suspension and related pH variations in the external medium, monitored by electrodes. *Plant Science Letters*, Elsevier, v.23, p.129-138, 1981.
- GEBHARDT, K.; FRIEDRICH, M. Micropropagation of *Calluna vulgaris* cv HE BEALE. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, Berlin, v.9, p.137-145, 1987.
- GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated in vitro. *HortScience*, Alexandria, v.26, n.8, p.1083, Aug. 1991.
- HARRINGTON, H.M.; HENKE, R.R. Amino acid transport into cultured tobacco cells. I. Lysine transport. *Plant Physiology*, Denville, v.67, n.2, p. 373-378, Oct. 1981.
- HAMMERSCHLAG, F.A.; BAUCHAN, G.R.; SCORZA, R. Factors affecting "in vitro" multiplication and rooting of peach cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, Dodrecht, v.8, p.235-242, 1987.

- KANEDA, Y.; TABEL, Y.; NISHIMURA, S.; HARADA, K.; AKIHAMA, T.; KITAMURA, K. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentration increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.], 1997.
- KERNS, H.R.; MEYER, M.M. Jr In vitro propagation of red-silver hybrid maples. *HortScience*, Alexandria, v.20, n.3, p.593, June 1985. (Abstr 506).
- LANE, D.W. Regeneration of apple plants from shoot meristem-tips. *Plant Science Letters*, Elsevier, v.13, p.281-285, 1978.
- LEIFERT, C.; PRYCE, S.; LUMSDEN, P.J.; WAITES, W.M. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing "in vitro". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.30, n.3, p.171-179, Sept.1992.
- LEVA, A.R.; BARROSO, M.; MURILLO, J.M. La moltiplicazione del melo con la tecnica della micropropagazione. Variazione del pH in substrati diversi durante la fase di moltiplicazione. *Rivista dell' Ortoflorofruitticoltura Italiana*, Firenze, v.68, p. 483-492, 1994.
- MANTE, S.; SCORZA, R.; CORDTS, J.M. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica*, and *Prunus cerasus*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, Dordrecht, v.19, p. 1-11; 1989.
- MEYER, M.M.; KERNS, H.R. Thidiazuron and in vitro shoot proliferation of *Celtis occidentalis* L. Abst. In Proc. VI Intl. Congr. *Plant Tissue & Cell Cult.*, Minneapolis; v.149, 1986.
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; ARMSTRONG, D. J.; SHUDO, K.; ISOGAI, Y.; OKAMOTO, T. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3, thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). *Phytochemistry*, Oxford, v.21, p.1509-1511, 1982.
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E., et al. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience*, Alexandria, v.22, n.6, p.1194-1197, Dec. 1987.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15 p.473-497, 1962.

- MURASHIGE, F. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology, California** v.25, p.135-166, 1974.
- NEMETH, G. Induction of rooting. In: Bajaj, Y.P.S. (ed) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin: Springer, 1986. p.49-64.
- OWEN, H.R.; WENGERD, D.; MILLER, A.R. Culture medium pH influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. **Plant Cell Reports, Berlin**, v.10, p. 583-586, 1991.
- PINTO, E.B.P.; ARELLO, E.F.; PINTO, C.A.B.P.; BARBOSA, H.P. Resposta à regeneração e crescimento de brotos "in vitro" de *Kielmeyera coriacea* quando influenciados por diferentes concentrações dos sais e de sacarose. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.26, n.1, p.57-61, jan./abr. 1996.
- PREECE, J.E.; IMEL, M.R. Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron* 'P. J. M. hybrids'. **Science Horticulture, Amsterdam**, v.48, p. 159-170; 1991a.
- PREECE, J.E.; HUETTEMAN, C.A.; PUELLO, C.H.; NEUMAN, M.C. The influence of thidiazuron on in culture of woody plants. **HortScience, Alexandria**, v.22, n.5, p. 1071, Oct. 1987.(Abst.259).
- PREECE, J.E.; HUETTEMAN, C.A.; ASHBY, W.C.; ROTH, P.L. Micro-and culting propagation of silver maple. I. Results with adult and juvenile propagules. **Journal of the American Society for Horticultural Science, Alexandria**, v.116, n.1, p. 142-148, Jan. 1991b.
- RAVEN, J.A. Biochemical disposal of excess H⁺ in growing plants? **New Physiology**, v.104, p.175-206, 1986.
- RAYLE, D.L.; CLELAND, R.E. Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. **Plant Physiology, Denville**, v.46, n.2, p. 250-253, Aug. 1970.
- RAYLE, D.L.; CLELAND, R.E. Control of plant cell enlargement by hydrogen ions. **Current Topics Developmental Biology, San Diego**, v.11, p. 187-214, 1977.
- SCOTT, E.S.; RAO, A.N.; LOH, C.S. Production of plantlets of *Shorea roxburghii* G. Don from embryonic axes culture "in vitro". **Annual Botany, London**, v.61, p.233-236, 1988.

- SCOTT, E.S.; RAO, A.N.; LOH, C.S. Preliminary studies of micropropagation of *Hopea odorata*, a dipterocarp tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.41, n.2, p. 193-196, May 1995.
- SHEAT, D.E.G.; FLETCHER, B.H.; STREET, H.E., Studies on the growth of excised roots. VIII. The growth of excised tomato roots supplied with various inorganic sources of nitrogen. **New Phytology**, Cambridge, v.58, p.128-141, 1959.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured "in vitro". **Symp Soc Exp Biol** v.11, p.118-131, 1957.
- SINGHA, S.; BHATIA, S.K. Shoot proliferation of pear cultures on medium containing thidiazuron and benzylamino purine. **HortScience**, Alexandria, v.23, n.5, p.803, Oct. 1988.
- SRISKADARAJAH, S.; MULLINS, NAIR, Y. Induction of adventitious rooting "in vitro" in difficult-to-propagative cultivars of apple. **Plant Science Letters**, Elsevier, v.24, p.1-9, Jan. 1982.
- THOMAS, J.C.; KATTERMAN, F.R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. **Plant Physiology**, Denville, v.81, n.2, p. 681-683, June 1986.
- TORREY, J.G. Root hormones and plant growth. **Annual Review of Plant Physiology**, California v.27, p.435-459, 1976.
- VACIN, E.F.; WENT, F.W. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, Chicago, v.110, p. 605-613, 1949.
- VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* (L.) Karst. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v.3, p.257-264, 1984.
- ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Simplified method for rooting apple cultivars "in vitro". **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.110, n.1, p.34-38, Jan. 1985.

CAPITULO III

EFEITOS DO TEGUMENTO, LUZ, MEIOS DE CULTURA, FITOREGULADORES, CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NA GERMINAÇÃO

1- RESUMO

FIDELIS, Iraci. Efeito da luz, tegumento, meio de cultura, concentração de reguladores de crescimento e sacarose na germinação de sementes e multiplicação de *Brosimum gaudichaudii* Tréc.. Lavras: UFLA, 1998. 109p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia)*.

A espécie *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae) é nativa dos cerrados brasileiros. Sua exploração é extrativa, o que pode leva-la ao desaparecimento.

Avaliaram-se o regime de luz, a presença ou não de tegumento, diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e reguladores de crescimento na germinação de sementes e multiplicação de *B. gaudichaudii*.

As sementes germinadas "in vitro", sob um regime de 16/8 horas luz/escuro e desprovidas de tegumento, mostraram um melhor desenvolvimento.

A concentração de sacarose até 6% foi efetiva para a obtenção de um maior número de gemas, tamanho de brotos e raízes. Quanto a indução de brotações e calos a partir de sementes, o melhor meio utilizado foi o MS. O regulador de crescimento com TDZ afetou na indução de calos e tamanho de brotações.

*Comitê Orientador: José Eduardo B.P. Pinto - UFLA (Orientador), Evaristo Mauro de Castro - UFLA, Manuel Losada Gavilanes - UFLA

2 ABSTRACT

FIDELIS, Iraci. Effect of light, culture medium, tegment, concentration of growth regulator and sucrose on seed germination and shoot multiplication *Brosimum gaudichaudii* Tréc.. Lavras: UFLA, 1998. 109p. (Dissertation - Masters degree in Agronomy, area of Fitotecnia)*

Brosimum gaudichaudii Tréc. (Moraceae) is a native specie of the Brazilian Cerrado (savanna-like vegetation), popularly known as "mama-cadela". This specie can be utilized as a medicinal plant. Trials were carried on under test light, present or not of tegment, differents culture medium, sucrose concentrations and growth regulator in the germination seed and multiplication of shoots of *B. gaudichaudii*. Seeds inoculated "in vitro" under 16/8 hours light/dark regime and without tegument showed the best growth. Seeds cultured in MS medium with different sucrose concentration showed statistic difference. The increase of sucrose until 6% was effective to obtain higher shoot number, shoot size and root size. Seeds were inoculated in MS solid medium exhibited the best growth. The influence of thidiazuron in callus formation and shoot length was effectived.

3- INTRODUÇÃO

Brosimum gaudichaudii Tréc. (Moraceae) é uma importante planta medicinal conhecida popularmente como mama-cadela. A sua constituição química revelou a presença, nas raízes, de duas furanocumarinas muito utilizadas para o tratamento de doenças da pele, em especial o vitiligo.

A mama-cadela é um arbusto de ocorrência nos cerrados brasileiros que está sendo explorada de forma indiscriminada. Sua propagação torna-se difícil por ser uma espécie com sementes recalcitrantes e enraizamento por estacas também difícil. A taxa germinativa de sementes "in vitro" e a sua multiplicação, tornam-se alternativas para a preservação da espécie.

Durante o início dos anos 80, foram descobertas possibilidades de iniciar a multiplicação de brotos diretamente da semente. As sementes são esterilizadas e inoculadas em um meio básico contendo uma citocinina. Na ocorrência da germinação há uma proliferação de brotos adventícios que podem ser repicados para um novo meio de cultura. Uma alta taxa de brotos é possível. Hisajima (1982) estima que 10 milhões de brotos de amendoeira poderiam ser multiplicados, teoricamente, de uma semente em um ano.

A multiplicação de brotos pode ser iniciada de sementes de muitas espécies; principalmente de dicotiledôneas. A técnica é efetiva tanto em espécies herbáceas como lenhosas: soja (Cheg, Saka e Voqui-Dinh, 1980; Hisajima, 1981); amêndoa (Hisajima, 1982); noz (Rodriguez, 1982).

O sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de um grande número de variáveis (Grattapaglia e Machado, 1990), com as quais, através das investigações experimentais, conduzem à determinação de protocolos ideais de micropropagação.

Uma variável importante para o crescimento e o desenvolvimento organizado dos explantes é a fonte de energia na forma de carboidratos. Sabe-se que a atividade fotossintética "in vitro" é limitada devido a baixa luminosidade (Lakso, Reisch e Nortensen, 1986) e pequena troca de gás (Zir, 1986). Uma fonte suplementar de carboidrato, tal como a sacarose, é importante para suportar o crescimento e diferenciação "in vitro", embora outros compostos (pentoses e hexoses) possam ser utilizados.

Este trabalho experimentou a viabilidade de se usar a semente como explante primário para multiplicação. Assim, os objetivos do trabalho foram: avaliar a germinação de sementes maduras com e sem tegumento em dois ambientes diferentes; avaliar a germinação de sementes imaturas inoculadas em meio MS com diferentes concentrações de TDZ e o desenvolvimento de sementes imatura nos meios WPM e MS, variando a concentração de TDZ.

4- REFERENCIAL TEÓRICO

A cultura "in vitro" requer, para se desenvolver, de acordo com as características de cada espécie, um meio nutritivo composto de elementos inorgânicos, açúcares, vitaminas, reguladores de crescimento e complexos orgânicos, além de condições ambientais propícias, como intensidade luminosa, temperatura, fotoperíodo, pH e umidade.

Dependendo dos objetivos e da metodologia de condução do trabalho, resultados diferenciados poderão ser alcançados, dependendo do genótipo, do explante em si, do meio de cultura e das condições de cultivo.

Os explantes contêm diferentes tipos de células e estas estão em diferentes estágios fisiológicos. Crocomo (1986) considera que em determinados tecidos, principalmente nos jovens, acontecem divisões celulares e formação de calos mais rapidamente, uma vez que essas são caracterizadas por crescimento vegetativo vigoroso e ausência de estruturas reprodutivas.

A maior eficiência apresentada pelos meios de Murashige e Skoog (MS) e Gamborg (B5) tem ampliado sua utilização na micropropagação de muitas espécies. Já o meio de White, considerado padrão por muitos anos, embora pobre em nutrientes, passou por modificações na tentativa de otimizar o crescimento de calos "in vitro". Estas modificações ocorreram principalmente no

aumento das concentrações de sais em geral, na diminuição da concentração de sódio e no acréscimo do teor de nitrogênio na forma amoniacal para complementação do nitrato, dando origem ao meio de Murashige e Skoog, em 1962, hoje utilizado no estabelecimento, na multiplicação e no enraizamento de muitas mono e dicotiledôneas.

Segundo Gamborg e Shyluk (1970), citados por Caldas, Haridasan e Ferreira (1990), o nitrogênio, quando fornecido apenas na forma de sais de amônio, pode causar toxidez às células cultivadas "in vitro", enquanto uma combinação de nitrogênio nas formas de amônio e nitrato estimula o crescimento de muitas espécies de plantas "in vitro".

Hasegawa (1980) e Werner e Boe (1980), citados por Grattapaglia e Machado (1980), recomendaram, para melhor enraizamento, a diluição do meio MS em 1/2, 1/3 e 1/4, variando conforme a espécie, enquanto Minocha (1984) recomendou meios mais diluídos como os de White, Knop e Heller. Estes mesmos autores afirmaram que a redução de nitrogênio na forma amoniacal tem sido recomendada para diminuir o efeito da vitrificação dos meios de cultura. Também Neals (1959), citado por George e Sherrington (1984), afirmou a importância do boro no enraizamento.

Em relação ao requerimento de uma fonte de energia (sacarose), apenas um limitado número de linhas de células de plantas foi isolado, sendo estas autotróficas quando cultivadas "in vitro". Células autotróficas são capazes de integralmente suplementar seu próprio carboidrato através da assimilação do dióxido de carbono durante a fotossíntese (Bergmann, 1967; Chandler et al. 1972; Anon, 1980; Larosa, Hasegawa e Bressan, 1981). Muitas culturas autotróficas têm sido apenas capazes de um crescimento vagaroso (Fukami e Hildebrandt, 1967), especialmente em ambiente atmosférico onde a concentração de dióxido de carbono é baixa.

Para o cultivo "in vitro" de células, tecidos e órgãos é necessário incorporar ao meio uma fonte de carbono. A sacarose é quase universalmente usada na micropropagação.

A sacarose participa do fornecimento de esqueleto de carbono e energia necessária para promover os processos de multiplicação de gemas Murashige e Skoog, 1962; uma vez que, as culturas "in vitro", em função da baixa intensidade luminosa, das condições limitadas de trocas gasosas e possivelmente pela não funcionalidade dos estômatos, a sua capacidade fotossintética é deficiente, tornando-se necessário o suprimento exógeno de carboidratos.

Carboidrato é um importante componente na nutrição e estrutura da planta. Embora a sacarose seja o principal açúcar transportado no floema, em muitas plantas, diversos outros compostos de carbono são identificados Loescher et al., (1985), Zimmerman e Ziegler (1975).

Em experimentos com regeneração de brotos adventícios de explantes de folhas de rizoma de maçã Ottawa-3 e M-9, Welander e Maheswaran (1992) mostram que ótima regeneração de brotos ocorreu entre 3% e 4% de sacarose no meio. Concentração mais alta causou pigmentação o que poderia ser um sinal de estresse osmótico. Não apenas a concentração de carbono é importante para a organogênese, mas também a fonte. Walander e Pawlicki (1994) mostraram que em rizoma de maçã M-9 cultivar Jork, ambas as porcentagens de segmentos foliares formando brotos adventícios e o número de brotos por segmentos nodais aumentaram na presença de sorbitol a 220 mM em comparação com outras fontes de carbono.

Estudos preliminares indicam a importância do metabolismo de carboidratos no processo inicial de formação de um órgão. A iniciação de um órgão está associada à utilização de amido acumulado e açúcar livre do meio. Por exemplo: durante a formação de brotos em calos de tabaco, um aumento na taxa de respiração foi observada e diferenças na atividade enzimática poderia ser

correlacionada com a acumulação e utilização de amido Thorpe (1978). A ativação da glicólise juntamente com a rota da pentose fosfato e o aumento na oxidação da glicose suportam a hipótese de que a iniciação da formação do órgão tem um alto requerimento em poder redutor (NADPH) Haissig (1982). Segundo Brown e Thorpe (1982), a sacarose estaria relacionada com o aumento do metabolismo de carboidratos, via glicolítica ou com a rota da pentose fosfato, fornecendo uma produção extra de ATP e poder redutor (NADP), requeridos para o processo de multiplicação. A grande demanda energética estaria relacionada com o processo de assimilação de nitrogênio. De acordo com Gamborg (1984), os níveis de sacarose e nitrogênio presentes no meio de cultura poderiam afetar os processos morfogênicos, além de atuar na eficiência de alguns reguladores de crescimento, como as citocininas, responsáveis pela indução de novas brotações.

Segundo Zenk et al. (1977), a biossíntese de alcalóides indólicos é beneficiada em altas concentrações de sacarose, o que leva possivelmente à síntese das auxinas, promovendo, junto com a giberelina, o alongamento dos entrenós das novas brotações, proporcionando um aumento no tamanho dos brotos.

O crescimento heterotrófico é convencional em cultura de brotos. As folhas tornam-se modificadas para esta condição e podem não ser fotossinteticamente competentes quando transferidas para um meio sem açúcar ou para o processo de aclimatização. Embora elas tenham cloroplastos e o sistema de transporte de elétrons, comparado com as folhas de plantas crescidas "in vivo" com a atividade da enzima fotossintética, com a ribulose difosfato carboxilase e com o nível de clorofila, são muito mais baixos que a normal (Grout e Donkin, 1987).

A taxa de fotossíntese de brotos crescidos em um meio contendo sacarose varia entre diferentes gêneros. Algumas espécies de *Dieffenbachia*

(Araceae) são capazes de uma eficiente fotossíntese da qual origina um balanço positivo de carbono (Grout e Price, 1987). Em muitas outras plantas, a fotossíntese é muito mais reduzida "in vitro" e a cultura de tecidos parece ser "lenta" para os tecidos utilizarem o açúcar no meio até quando as condições forem favoráveis ao crescimento autotrófico; neste caso o dióxido de carbono utilizado é diminuído pela presença da sacarose do meio (Langford e Wainwright, 1988).

O crescimento autotrófico de plântulas "in vitro" é possível, embora a taxa de fotossíntese possa ser menos do que àquela comparada a plantas crescidas "in vivo" (Aoki e Oda, 1988; Pospisilova et al., 1987). Crescimento heterotrófico ou mixotrófico é ainda necessário nos primeiros estágios do início do cultivo para muitos explantes.

Há diversos relatos (Kozai, Iwanami e Fujiwara, 1987; Kozai, Oki e Fujiwara, 1987; Kozai e Iwanami, 1988; Arai et al., 1989) de que brotos, segmento nodal ou plântulas crescidas debaixo de alta luz e ambiente enriquecido com dióxido de carbono crescem mais depressa e sobrevivem melhor do que àquelas crescidas debaixo de condições mixotrófico. Plantas são menos sujeitas à contaminação por fungos e bactérias e podem ser crescidas mais tarde em vaso (casa de vegetação) sem perda, devido a contaminação.

Esforços para reduzir o fotoautotrofismo pela omissão de sacarose do meio têm sido mal sucedidos (Vasil e Hildebrandt, 1966). Entretanto, a cultura fotoautotrófica de diversas espécies tem, sido estabelecida pelo aumento da concentração de CO₂ e intensidade de luz dentro do ambiente de crescimento, em conjunto com a redução ou omissão de açúcar do meio. Debaixo destas condições, o tecido da planta, presumivelmente, usa CO₂ como sua fonte de carbono.

Por outro lado, os fitoreguladores afetam a micropropagação. Segundo Altman e Gorew (1977), citados por Grattapaglia e Machado (1990), a adição de

fitorreguladores em um meio de cultura tem o objetivo principal de suprir deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, estimulando respostas no crescimento, alongamento e multiplicação, dependendo do estado fisiológico dos explantes, que por sua vez, são influenciados pela época do ano e pelas condições gerais da planta-matriz.

As pesquisas realizadas por Darwin, citato por Taiz e Zeiger (1991), são consideradas por muitos cientistas como precursoras das modernas pesquisas com hormônios vegetais. Este cientista expôs coleótilos de *Avena* à iluminação lateral e concluiu que alguma influência é transmitida do ápice para as partes mais baixas, causando uma curvatura do coleótilo. Em 1928 Went, citato por Taiz e Zeiger (1991), afirmou que existia uma substância na seiva de ápices dos coleótilos de *Avena* e foi capaz de explicar a natureza correlativa da resposta tropística e o controle endógeno da taxa de crescimento com base nesta substância, denominada de auxina (do Grego *auxein*, para aumentar). Em 1934, Kogl e Kostermans e em 1935, Tillmann purificaram o ácido indoleacético (AIA) de materiais vegetais.

Desde então, muito se tem pesquisado sobre a auxina e seus efeitos no crescimento vegetal. Experimentos feitos revelam que a auxina aumenta a plasticidade da parede celular. A primeira citocinina vegetal (de sementes de milho) foi isolada por Letham e Shannon (1946), é conhecida por zeatina. A era moderna de pesquisas com as citocininas iniciou-se em 1955, com a separação do DNA do esperma de arenque, o primeiro estimulante conhecido da divisão celular chamado de cinetina e identificado como 6-furfurilaminopurina (Skoog e Miller, 1957).

A auxina tem uma larga variedade de efeitos no crescimento de plantas e na morfogênese. Ela promove a divisão celular no caule, mas pode inibir o alongamento da raiz e os botões laterais.

Já as citocininas estão ligadas à proliferação celular nos tecidos que as contêm ou são suplementadas com um nível ótimo de auxina. Há evidências de que os dois hormônios participam na regulação do ciclo celular, mas a auxina pode regular os eventos conduzindo à replicação do DNA, enquanto a citocinina regula os eventos conduzindo à mitose (Jouanneau e Tandau, 1973). O alto nível de auxina, relativo à citocinina, estimula a formação de raízes, enquanto o contrário induz à formação de brotos. Em um nível intermediário os tecidos crescem como calos não diferenciados (Skoog e Miller, 1965).

5- MATERIAIS E MÉTODOS

5.1- CONDIÇÕES GERAIS DOS EXPERIMENTOS

Como fonte de explantes para os diferentes experimentos foram utilizadas sementes maduras e imaturas de mama-cadela. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As sementes foram desinfestadas em solução comercial, contendo 2% de hipoclorito de sódio ajustado para pH 5,5, por 10 minutos, sob agitação. Após os frutos serem lavados quatro vezes em água autoclavada em câmara de fluxo laminar, estes foram preparados para os diferentes experimentos.

Em todos os experimentos as sementes foram colocadas em tubos de ensaio (25x150 mm) e (25 x 400mm); os meios foram solidificados com 0,6% de ágar, previamente autoclavado a 121 ± 1 °C, por 20 minutos. Cada tubo foi fechado com tampa plástica e suas bordas protegidas com vitafilme^R. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 26 ± 1 °C, fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e intensidade luminosa de 25 μ mol.

$s^{-1} \cdot m^{-2}$ dada por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria. Em todos os experimentos os dados foram transformados pelo raiz de $x+0,5$.

5.2- EXPERIMENTO I - GERMINAÇÃO DE SEMENTE MADURA "IN VITRO".

Após assepsia das sementes, estas foram inoculadas em meio água-agar (0,6%). Em um lote de sementes retirou-se o tegumento e de outro lote manteve-se o tegumento.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado 2 regimes de luz e com ou sem tegumento (4 tratamentos), com 5 repetições, sendo cada parcela constituída por 8 tubos de ensaio e uma semente por tubo. Os tratamentos foram: Trat. 1: 16 h. luz e 8 h. escuro com tegumento; Trat. 2: 24 h. no escuro com tegumento; Trat. 3: 16 h. luz e 8 h. escuro sem tegumento; Trat. 4: 24 h. escuro sem tegumento.

5.3- EXPERIMENTO II - EFEITO DA SACAROSE NA GERMINAÇÃO DE SEMENTE IMATURA "IN VITRO".

Após assepsia das sementes, estas foram inoculadas em meio Murashige e Skoog (1962)-MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose 3, 6, 8 e 12%.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 tratamentos (diferentes concentrações de sacarose), com 5 repetições sendo cada parcela constituída por 8 tubos de ensaio e uma semente por tubo.

5.4- EXPERIMENTO III - EFEITO DOS MEIOS DOS MS E WPM E CONCENTRAÇÃO DE TDZ NA PROLIFERAÇÃO DE BROTO EM SEMENTES IMATURA.

Após assepsia das sementes, estas foram inoculadas em dois meios de cultura Murashige e Skoog, 1962 (MS) e "Woody Plant Medium" (WPM) suplementado com thidiazuron nas concentrações 0, 1, 2, 4 e 8 mg/L.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado 2 meios de cultura e 5 concentrações de TDZ, totalizando 10 tratamentos com 5 repetições, sendo cada parcela constituída por 5 tubos de ensaio e uma semente por tubo.

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 GERMINAÇÃO DE SEMENTES MADURA "IN VITRO"

Sementes maduras de mama-cadela cultivadas "in vitro", meio MS, com ou sem tegumento e em fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro e no escuro apresentaram diferentes resultados.

Pela análise de variância (Tabela 3-1), verificam-se diferenças significativas entre tratamentos, ($P < 0,01$) para N° gemas (número de gemas), T.P.A. (tamanho da parte aérea), N° raízes (número de raízes), T. raízes (tamanho de raízes) e % germinação (percentagem de germinação).

TABELA 3-1 Resumo da análise de variância (quadrado médio e significância) para número de gemas, tamanho da parte aérea (T.P.A.), tamanho de raízes e percentagem de germinação formados a partir de sementes de mama-cadela cultivadas in vitro em meio água + agar na presença ou não de luz e com ou sem tegumento. UFLA Lavras/ MG.

Quadrado médio						
	g.l.	Nº gemas	T.P.A.	Nº raízes	T. raízes	% ger
Tratamento	3	1,6208**	3,093**	1,166**	2,941**	0,084
Resíduo	16	0,087	0,097	0,103	0,194	0,00
C.V.		16,57	17,45	19,74	21,36	5,8
Média		1,78	1,78	1,63	2,06	1,2

* significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F.

Após obtenção dos resultados da análise de variância, fez-se um teste de média (Tukey) para todos os parâmetros citados (Tabela 3-2). Nas condições do experimento, observou-se que o seedling desenvolveu melhor nas condições de 16 h luz e 8 h escuro sem tegumento (Trat.3), principalmente a germinação (Figura 3-1), apesar de não diferir estatisticamente do regime de 24 h de escuro sem tegumento (Trat.4) para número de gemas, raízes e % de germinação. Este tratamento apresentou plantas estioladas. O fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro e sementes sem tegumento (Trat. 3), proporcionou em média, 3,45 gemas e parte aérea com 2,23 cm, enquanto o tratamento com o mesmo regime de luz, mas com tegumento apresentou em média 0,57 gemas e tamanho da parte aérea 0,32 cm. Também foi obtido neste tratamento (Trat.3) em média 2,34 raízes por seedling e 3,98 cm em tamanho de raízes a mais do que as sementes cultivadas no escuro e com tegumento (Trat. 1).

TABELA 3-2 Resumo do teste de média (Tukey 5% de probabilidade) para os parâmetros número de gemas, T.P.A., número de raízes, tamanho de raízes e percentagem de germinação quando sementes de mama-cadela foram cultivadas a 4 diferentes tratamentos. UFLA Lavras/ MG.

Tratamentos	Nº gemas	T.P.A. (cm)	Nº raízes	Tam. Raízes	% germin.
1	0,57 b	0,32 c	0,42 c	0,82 c	22 b
2	0,79 b	0,68 bc	0,61 bc	1,55 bc	14 b
3	3,45 a	2,23 b	2,34 ab	3,98 b	65 a
4	4,79 a	7,33 a	3,89 a	8,42 a	77 a

Dados transformados segundo raiz ($x+1$), médias seguidas de mesma letra não difere entre si pelo teste Tukey ($P > 0,05$).

Pelos resultados do experimento, permite deduzir-se que a luz foi um fator físico que não teve efeito na percentagem de germinação das sementes, uma vez que, estatisticamente, não houve diferenças entre os regimes de luz 16/8 horas luz/escuro (65%) (trat.3) e 24 horas no escuro (77%) (trat.4); mas, a presença do tegumento foi um fator limitante para a percentagem de germinação (Trat. 1 e 2). O efeito da luz foi significativo principalmente no tamanho e número de raízes formadas, visto que o tratamento 4 teve maior número e tamanho das mesmas, comparado com o tratamento 3.

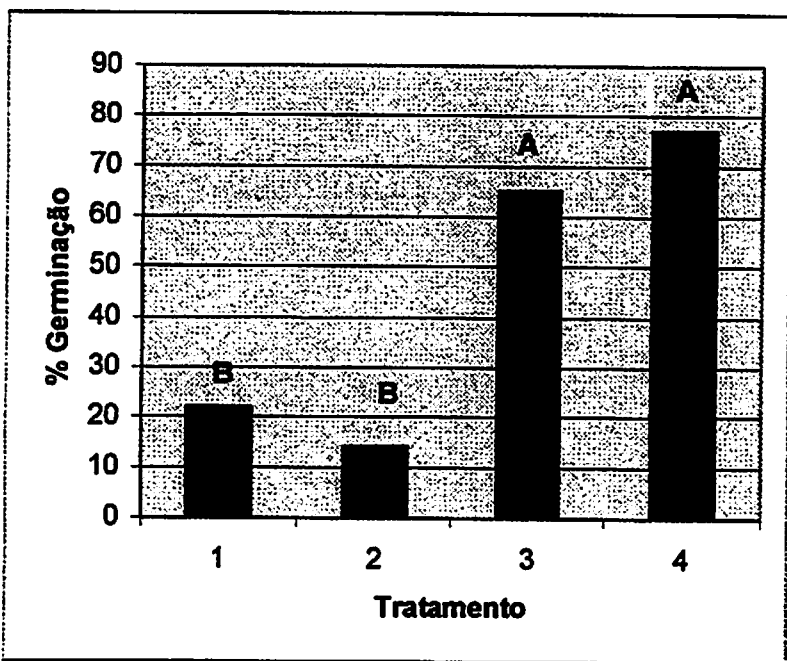


FIGURA 3-1 Percentagem de germinação de sementes de mama-cadela in vitro. 1) com tegumento 16luz/8escuro, 2) com tegumento escuro, 3)sem tegumento 16 luz/ 8 escuro, 4) sem tegumento escuro, após 30 dias de cultivo in vitro.

Torrey (1952) também observou que a luz afetou vários parâmetros por ele analisado, principalmente o alongamento das raízes. Ele sugere que a coifa da raiz seja o sítio da fotopercepção. Feldman (1984), Pickard (1985) e Masuda (1962) discutiram o mecanismo pelo qual a luz conduz a inibição da raiz e argumentaram que esta promove a formação de um inibidor de crescimento não volátil o qual poderia ser ABA (Gaspar, 1973), ou xanthoxin (Wilkins e Wain, 1974; Pilet e River, 1980; Feldman, Arrouyve e Sum, 1985).

O tegumento das sementes mantém úmida as partes internas, protegendo-as contra choques e abrasões; regula a velocidade de reidratação e trocas gasosa, e, principalmente, afeta a germinação das sementes.

Esta inibição do tegumento na germinação das sementes foi observado no presente experimento com a espécie *Brosimum gaudichaudii* Tréc, em que os tratamentos (1 e 2) nos quais o tegumento estava presente, proporcionaram uma menor percentagem de germinação (Figura 3-1).

Também a inibição da germinação da semente pela presença do tegumento tem sido observado por Ferri (1971) e Popinigis (1977).

6.2- EFEITO DA SACAROSE NA GERMINAÇÃO DE SEMENTE IMATURA "IN VITRO"

Sementes imaturas de mama-cadela cultivada "in vitro" em meio MS com 4 concentrações de sacarose (3, 6, 8 e 12%) apresentaram diferenças na germinação. Pelas Tabela 3-3 e 3-4 da análise de variância, observou-se que as diferentes concentrações de sacarose utilizadas apresentaram efeitos diferentes ($P < 0,01$) para as variáveis analisadas; N-raízes (número de raízes), T-raízes (tamanho de raízes), N-folhas (número de folhas), N-gemas (número de gemas) e T.P.A. (tamanho da parte aérea) tanto aos 30 como aos 60 dias.

TABELA 3-3 Resumo das análises de variância (quadrado médio e significância) para N-raízes, T-raízes, N-folhas, N-gemas, T.P.A. e % germ. quando sementes de mama-cadela foram cultivadas no meio MS em 4 diferentes níveis de sacarose (avaliação ao 30 dias). UFLA. LAVRAS/MG 1998.

C.varia.	G.L.	N-raízes	T. raízes	N folhas	N gemas	T.P.A cm	%
Sacarose	3	0,5438**	0,9937**	0,0519**	0,5903	0,0381**	0
Erro	16	0,1292	0,1507	0,0054	0,0421	0,0104	
c.v. %		22,5	21,8	6,7	31,6	9,1	
Média		1,60	1,78	1,10	0,65	1,12	

TABELA 3-4 Resumo das análises de variância (quadrado médio e significância) para N-raízes, T-raízes, N-folhas, N-gemas, T.P.A. e % germ. quando sementes de mama-cadela foram cultivadas no meio MS em 4 diferentes níveis de sacarose (avaliação ao 60 dias). UFLA. LAVRAS/MG 1998.

C.varia.	G.L.	N. raízes	T. raízes	N. folhas	N. gemas	T.P.A.	%
Sacarose	3	1,1168**	2,0741**	0,3410**	0,4255**	0,4371**	0
Erro	16	0,1075	0,2931	0,0318	0,0332	0,0575	
c.v. %		16,22	19,9	13,1	11,3	15,1	
Média		2,02	2,73	1,36	1,62	1,59	

Pela análise das figuras seguintes verificou-se que o número e tamanho de raízes, assim como o número de gemas aos 30 e 60 dias, Figuras 3-2, 3-3 e 3-5 tiveram um aumento com as crescentes doses de sacarose até aproximadamente 6-7%, decrescendo após estes valores. Já o tamanho da parte aérea (T.P.A.) Fig. 3-6, aos 60 dias, de forma idêntica foi aumentando até a concentração de 6-7% de sacarose, decrescendo após este valor. O número de folhas tanto aos 30 como aos 60 dias foram inibidos a cada dose de sacarose,

Fig. 3-4. O número de gemas aos 60 dias subiu de 1,7 na concentração de 3% de sacarose para 1,8 na concentração de 6% caindo para 1,2 na concentração de 12% de sacarose. Já o tamanho da parte aérea aos 60 dias variou entre os valores 1,7 cm, 1,8 cm e 1,2 cm quando as concentrações de sacarose variaram entre 3, 6 e 12%.

$$30 \text{ d: } y = 0,9076 + 0,2970x - 0,0232x^2 \quad R^2 = 0,9837^{**}$$

$$60 \text{ d: } y = 0,3181 + 0,5969x - 0,0415x^2 \quad R^2 = 0,9983^{**}$$

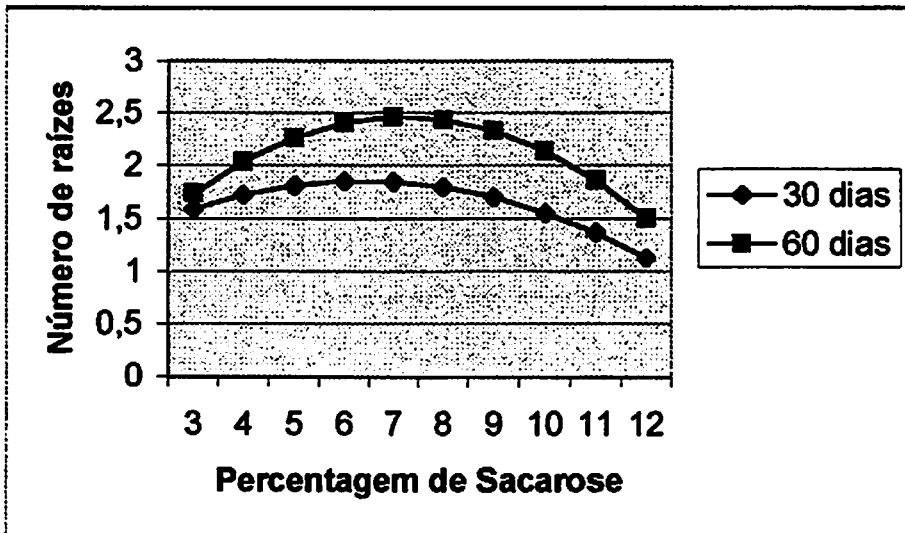


FIGURA 3-2 Número de raízes formadas a partir do cultivo de sementes maduras de mama-cadela in vitro no meio MS em 4 doses de sacarose (3, 6, 8 e 12 %).

30 d: $y = 0,6786 + 0,4456x - 0,0337x^2$ $R^2 = 0,9974^{**}$
 60 d: $v = 0,4723 + 0,7992x - 0,0560x^2$ $R^2 = 0,9965^{**}$

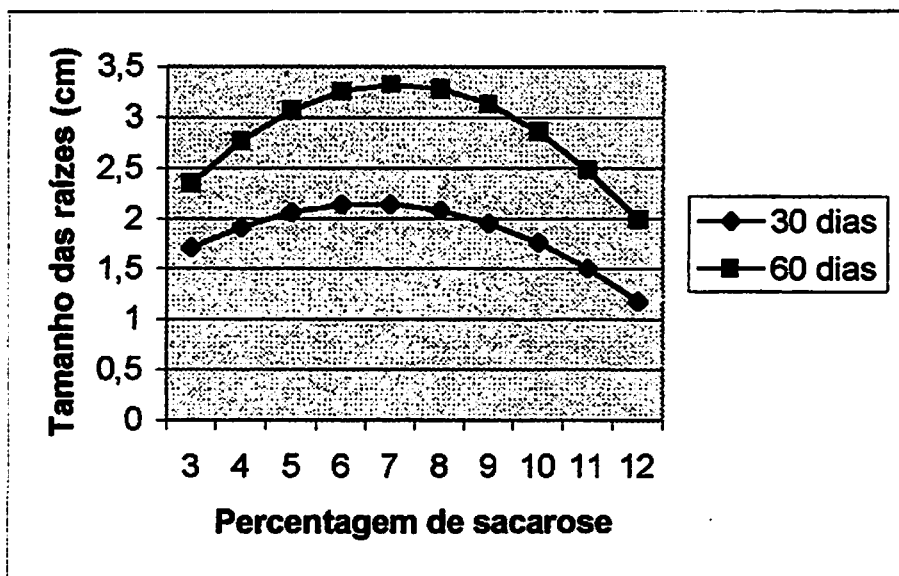


FIGURA 3-3 Tamanho de raízes formadas a partir do cultivo de sementes maduras de mama-cadela in vitro no meio MS em 4 doses de sacarose (3, 6, 8 e 12 %).

30 d: $y = 1,2864 - 0,0255x$ $R^2 = 0,8952^{**}$

60 d: $y = 1,8479 - 0,0670x$ $R^2 = 0,9389^{**}$

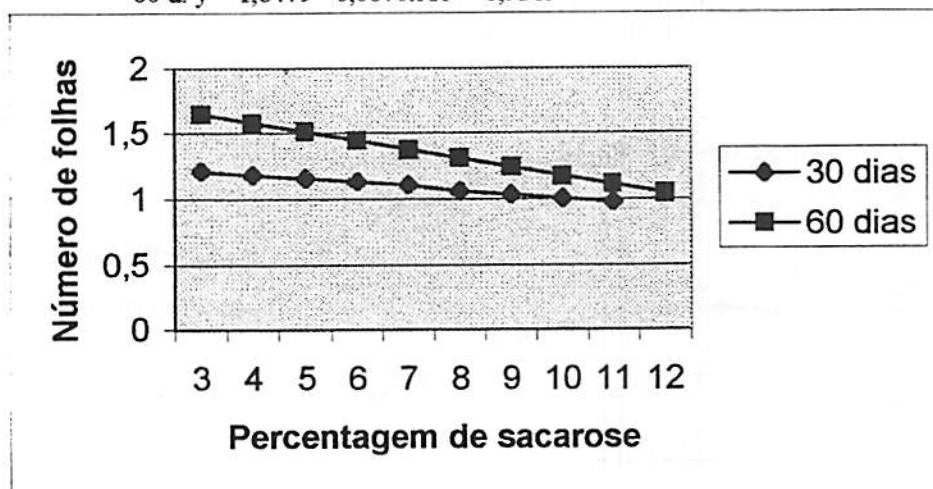


FIGURA 3-4 Número de folhas formadas a partir do cultivo de sementes maduras de mama-cadela in vitro no meio MS em 4 doses de sacarose (3, 6, 8 e 12 %).

$$30 \text{ d: } y = 0,6817 + 0,1001x - 0,0120x^2 \quad R^2 = 0,9551^*$$

$$60 \text{ d: } y = 1,5090 + 0,1166x - 0,0116x^2 \quad R^2 = 0,7993^*$$

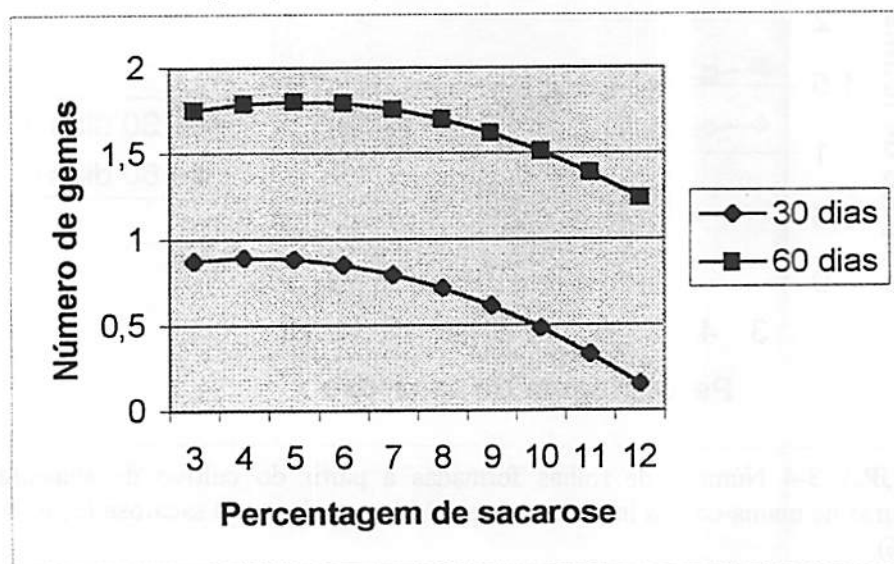


FIGURA 3-5 Número de gemas formadas a partir do cultivo de sementes maduras de mama-cadela in vitro no meio MS em 4 doses de sacarose (3, 6, 8 e 12 %).

30 d: $y = 1,2792 - 0,0217x$ ** $R^2 = 0,8807$ **
 60 d: $y = 1,3523 + 0,1602x - 0,0146x^2$ $R^2 = 0,9160$ *

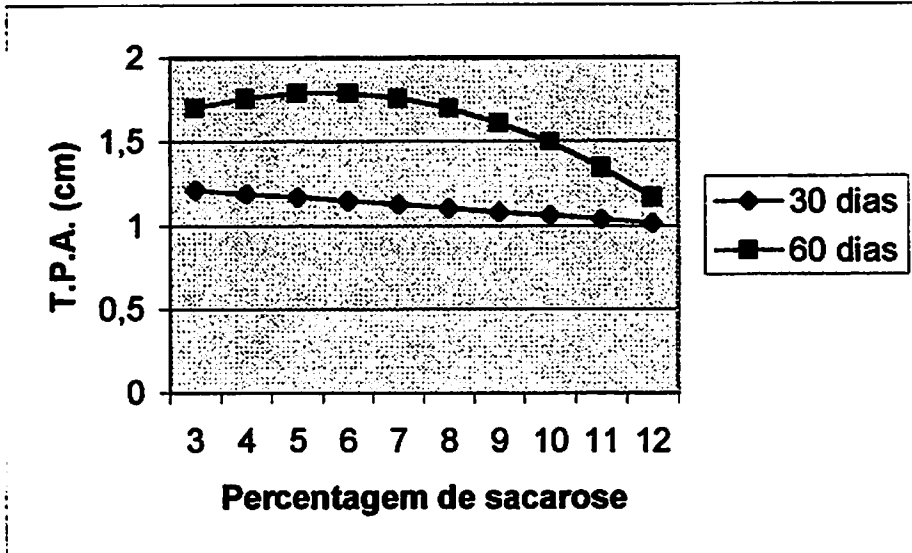


FIGURA 3-6 T. P. A. (tamanho da parte aérea) formadas a partir do cultivo de sementes maduras de mama-cadela *in vitro* no meio MS em 4 doses de sacarose (3, 6, 8 e 12 %).

Segundo Murashige, 1974; George e Sherrington, 1984; Thorpe e Patel, 1984; Ozias-Akins e Vasil, 1985, a sacarose é o carboidrato mais utilizado nas concentrações de 2 a 4% (p/v). Com o cultivo "in vitro" de sementes imaturas de mama-cadela em meio de Murashige e Skoog (1962), observou-se que o melhor desenvolvimento ocorreu com a utilização de 6 a 7% de sacarose. Acima destas percentagens ocorreu uma inibição do desenvolvimento.

O tamanho das brotações (T.P.A.) aos 60 dias pouco aumentou (6%) quando a porcentagem de sacarose no meio variou entre 3 e 6%, mas teve uma queda considerável no tamanho (33%) quando a sacarose variou no meio de

aos 60 dias, também não foram alteradas entre 3 e 6% de sacarose; mas reduzidas em 33% nas brotações quando a percentagem de sacarose subiu de 6% para 12%.

Quanto à raízes, o seu número foi aumentado em 41% quando a concentração do meio variou entre 3 e 6% de sacarose e reduzidas em 37% quando a variação da sacarose do meio oscilou entre 6 e 12%. O tamanho destas raízes também aumentou em 23% e reduziu em 43% quando a sacarose variou nos mesmos intervalos referidos acima.

Altas concentrações de carboidratos são necessárias para a formação de raízes adventícias (Pierik, 1987). Esse efeito foi observado por Welander (1976) em *Beta vulgaris*, Chong e Pua (1985) em maçã e Shibli, Smith e Spomer, (1992) com vários cultivares de crisântemo. Ao contrário, George e Sherrington (1984), citam que concentrações elevadas de açúcar podem inibir a formação de raízes. May e Trigiano (1991) não observaram indução de brotações ou enraizamento de explantes de crisântemo em meio com sacarose em concentrações inferiores a 9%.

Concentrações elevadas de sacarose afetaram negativamente o tamanho dos brotos. Esta inibição pode ser devida à elevação do potencial osmótico do meio, diminuindo assim a disponibilidade de água, Shibli, Smith e Spomer (1992) e May e Trigiano (1991).

Em cultivo de sementes imaturas de mama-cadela observou-se que tanto a parte aérea das plântulas formadas como o sistema radicular foram afetados pela percentagens de sacarose do meio, sendo que a percentagem ótima foi de 7% pela equação de regressão. Também se observou que o percentual de variação foi mais significativo no sistema radicular; tanto no aumento do mesmo, entre as percentagens de sacarose de 3 e 6%, como na redução do sistema radicular (número e tamanho), quando as concentrações de sacarose do meio de cultura MS variaram entre 6 e 12%.

6.3 EFEITO DOS MEIOS MS E WPM E CONCENTRAÇÃO DE TDZ NA PROLIFERAÇÃO DE BROTOS EM SEMENTES IMATURA

Os meios de cultura WPM e MS, adicionado das concentrações de TDZ (0, 1, 2, 4 e 8 mg/L), proporcionaram diferentes efeitos no desenvolvimento "in vitro" de sementes imaturas de mama-cadela. Pela análise de variância (Tabela 3-5), verifica-se que o número e tamanho dos brotos foram afetados pelos meios de (P < 0,01). Já o meio, o TDZ e interação meio e TDZ só tiveram efeitos significativos (P < 0,01) para o tamanho das brotações formadas.

TABELA 3-5- Resumo da análise de variância (quadrado médio e significância) para número de brotos e tamanho de brotos quando sementes de mama-cadela foram cultivadas nos meios WPM e MS em 5 diferentes concentrações de TDZ. Avaliação feita aos 60 dias após a inoculação. UFLA Lavras/ MG, 1998.

Causas de variação	G.L.	Número brotos	Tamanho brotos
Meio	1	1,2388**	0,2644**
TDZ	4	0,2330 ^{NS}	0,2882**
Meio x TDZ	4	0,1412 ^{NS}	0,2249**
Erro	40	0,1190	0,0504
c.v. %		25,8	20,4
Média		1,34	1,10

** significativo a 1% pelo teste de F

NS não significativo

No meio MS, independente das concentrações de TDZ utilizadas, o número e tamanho de brotos foram superiores (61%) em relação ao meio WPM (dados não apresentados). Diferente do encontrado por Declerck e Korban, 1994 e por Edson, Wenny e Leege-Brusven, 1994, para a espécie lenhosa dogwood

que dentre os meios WPM, MS e SH o meio WPM foi o que suportou um índice mais alto de proliferação de brotações.

Pinto et al. (1996) estudando o desenvolvimento de *Kiemyera coriacea*, verificaram que o maior número médio de brotos foi obtido usando concentrações salinas integrais do meio MS. Reduzindo estas concentrações a 1/3 das concentrações normais de sais, chega-se perto da concentração de WPM no meio, proporcionando acentuada redução no número de brotos; semelhante aos encontrados para *Brosimum gaudichaudii*.

Já Upreti e Dhar (1996), estudaram um protocolo para propagação "in vitro" da leguminosa liana, *Bauhinia vahlii*. Eles observaram que os segmentos nodais (brotações) obtidos a partir de cotilédones de plantas germinadas "in vitro" nos meios MS, WPM, B₅ e 1/2 MS, contendo 1,0 µM de TDZ, a melhor resposta na proliferação de brotos (96%) e multiplicação (5,6 brotos explante) foi com o cultivo em meio MS.

O cultivo de sementes imaturas de mama-cadela "in vitro" em meio MS, em diferentes concentrações de TDZ, estão representados nas figuras 3-8 e 3-9.

O tamanho das brotações formadas foi sendo reduzido pelas concentrações de TDZ utilizadas. As brotações formadas, que no meio sem presença de TDZ eram de 1,3 cm em média, foram diminuindo até 0,9cm na concentração de 4 mg/L de TDZ, com um pequeno aumento na concentração de 8 mg/L de TDZ.

d: 60 dias $y = 1,2927 - 0,1391x + 0,0134x^2$ $R = 0,5969^*$

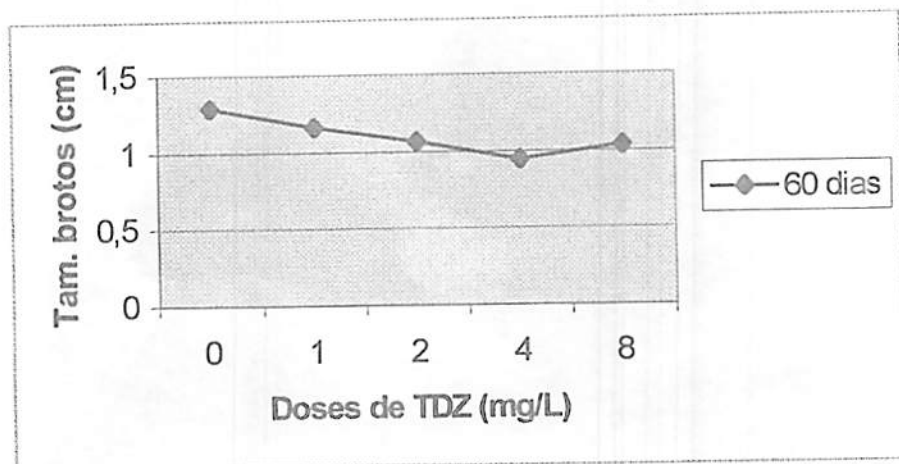


FIGURA 3-7 Tamanho médio de brotos obtidos pelo cultivo de sementes imaturas de mama-cadela "in vitro" no meio MS após 60 dias de inoculação



FIGURA 3-8 Aspectos de brotações obtidas a partir do cultivo de sementes imaturas de mama-cadela "in vitro" no meio MS com TDZ (60 dias)

7- CONCLUSÕES

As sementes madura de mama-cadela tiveram uma maior taxa de germinação em 16/8 horas luz/escuro e com sementes desprovidas de tegumento. A parte aérea neste tratamento ficou em média com 2,2 cm e com 3,5 gemas. Isto representa 86% a mais no tamanho e 83% a mais de gemas por segmentos nodais desenvolvidos em relação ao pior tratamento; sementes com tegumento e com 16/8 horas luz escuro. A germinação das sementes sem tegumento e em fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro foi de 65%, representando 78% a mais do que as sementes cultivadas no pior dos tratamentos.

O cultivo "in vitro" no meio MS em diferentes percentagens de sacarose afetou tanto a parte aérea quanto o sistema radicular nas plântulas formadas a partir de sementes imaturas. Verificou-se pelas equações de regressão e gráficos que se poderia utilizar até 7% de sacarose; a partir deste percentual começava a ocorrer inibição da parte aérea e sistema radicular.

A formação de brotações em sementes imaturas cultivadas nos meios MS e WPM, em diferentes concentrações de TDZ, tiveram efeitos diferenciados, sendo que no meio MS proliferaram maior número de brotações e estas tiveram o seu tamanho reduzido a cada aumento de TDZ no meio.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTMAN, A.; GOREW, R. Horticultural and physiological aspects of *citrus* bud culture. *Acta Horticultural*, The Hague, v.78, p. 51-60, 1977.
- AOKI, S.; ODA, M. Sensing of photosynthetic capacities of seedling lettuce eith chlorophyll florescence. *Acta Horticulture*, Leuven, v.230, p.363-370, 1988.

- ARAI, S.; ASAO, H.; KAWABATA, R.; KOBATAKE, H. Effects of CO₂ enrichment on the growth of strawberry plantlets regenerated from shoot tip culture. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v.58, p.252-253, 1989.
- BERGMANN, L. Wachstum grüner suspensionskulturen von *Nicotiana tabacum* Var. 'Samsun' mit CO₂ als Kohlenstoffquelle. **Planta**, Berlin, v.74, p.243-249, 1967.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTJP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.37-70.
- CHANDLER, M.T.; TANDEAU, DE MARSAC, N.; KOUCHKOVSKY, K. Photosynthetic growth of tobacco cells in liquid suspensions. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v.50, p.2265-2270, 1972.
- CHENG, Y.; SAKA, H.; VOQUI-DINH, T.H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. **Plant Science Letters**, Elsevier, v.1, p.91-99, 1980.
- CHONG, C.; PUA, E.C. Carbon nutrition of 'Ottawa 3' apple roostock during stages of "in vitro" propagation. **The Journal of Horticulture Science**, Achsford, v. 60, n.3, p.285-290, Jul.1985.
- CROCOMO, Otto J. Perspectivas da biotecnologia na agricultura. **Informações Agrônômicas**, Campinas, v.36, p.1-7, dez. 1986.
- DECLERCK, V.; KORBAN, S.S. Effects of source of macronutrients and plant growth regulator concentration on shoot proliferation of *Cornus florida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.38, n.1, p. 57-60, July 1994.
- EDSON, J. L.; WENNY, D.L.; LEEGE-BRUSVEN, A. Micropropagation of pacific dogwood. **HortScience**, Alexandria, v.29, n.11, p.1355-1356, Nov. 1994.
- FELDMAN, L.J. Regulation of root development. **Annual Review of Plant Physiology**, California, v.35, p.223-242, 1984.

- FELDMAN, L.J.; ARROYAVE, N.A and SUN, P.S. Abiscisic acid, xanthoxin and violaxanthin in the caps of gravistimulated maize roots. *Planta*, Berlin, v.166, n.4, p. 483-489, Dec. 1985.
- FUKAMI, T.; HILDEBRANDT, A.C. Growth and chlorophyll formation in edible green plant callus tissues "*in vitro*" on media with limited sugar supplements. *Botany Magazine*, Tokyo, v.80, p.199-212, 1967.
- GAMBORG, O. L. Plant cell cultures: Nutrition and media. In: VASIL, I.K. **Cell cuture and somatic cell genetic of plants - Laboratory procedures and their applications**. Orlando: Academic Press, 1984. v.1 p.18-26.
- GAMBORG, O. L.; SHYLUK, J.P. The culture of plant cells with ammonium salts as a sole nitrogen source. *Plant Physiology*, Denville, v.45, n.4, p.598-600, Oct.1970.
- GASPAR, T. Inhibition of root growth as a result of methleneoxindole formation. *Plant Science Letters*, Elsevier, v.1, p.115-118, 1973.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Basingstoke, Exegetics, 1984. 709 p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Microprogapação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. 433p.
- GROUT, B.W.W.; DONKIN, M.E. Photosynthetic activity of cauliflower meristem cultures "*in vitro*" and at transplanting into soil. *Acta Horticulture*, Leuven, v.212, p.323-327, 1987.
- GROUT, B.W.W.; PRICE, F. The establishment of photosynthetic independence in strawberry cultures prior to transplanting. pp. 55-60 in Ducaté et al. (eds.) 1987 (q.v.), 1987.
- HAISSIG, B.H. Activity of some glycolytic and pentose phosphate pathway enzymes during the development of adventitious roots. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, v.55, p.261-272, 1982.
- HISAJIMA, S. Multiple shoot formation from various kinds of plant seeds. *Plant Physiology*, Denville, v.67 (suppl.). p.28, 1981 (Abst. 147).

- HISAJIMA, S. Multiple shoot formation from almond seeds and an excised single shoot. **Agriculture Biology Chemistry**, v.46 p.1091-1093, 1982.
- JOUANNEAU, J.P.; TANDEAU M.N. Stepwise effects of cytokinin activity and DNA synthesis upon mitotic cycle events in partially synchronized tobacco cells. **Experimental Cell Research**, San Diego, v.77, p.167-174, 1973.
- KANEDA, Y.; Tabei, Y.; NISHIMURA, S.; HARADA, K.; AKIHAMA, T.; KITAMURA, K. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentration increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.], 1997.
- KOGL, F.; KOSTERMANN, D.G.F.R. Hetero-auxin as stoffwechselprodukt niederer pflanzlicher organismen. Isolierung aus Hefe. **Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.**, v.228, p.113-121, 1935.
- KOZAI, T.; IWANAMI, Y. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plant growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v.57, p.279-288, 1988.
- KOZAI, T.; IWANAMI, Y.; FUJIWARA, K. Effects of CO₂ enrichment on the plantlet growth during the multiplication stage. **Plant Tissue Culture Letters**, Tokyo, v.4, n.1, p.22-26, 1987.
- KOZAI, T.; OKI, H.; FUJIWARA, K. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photosynthetic photon on growth of tissue-cultured *Cymbidium* plantlets during the preparation stage. pp.135-141 in Ducaté *et al.* (eds.) 1987 (q.v.), (1987).
- LAKSO, A.N.; REISCH, B.I.; NORTENSEN, J. Carbon dioxide enrichment for stimulation of growth of "in vitro" propagated grapevines after transfer culture. **Journal of American Society Horticultural Science**, Alexandria, v.111, n.4, p.634-638, Jul.1986.
- LANGFORD, P.J.; WAINWRIGHT, H. Influence of sucrose concentration on the photosynthesis of "in vitro" grown rose shoot. **Acta Horticulture**, Leuven, v. 227, p.305-310, 1988.

- LAROSA, P.C.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Initiation of photoautotrophic potato cells. **HortScience**, Alexandria, v.16, n.3, p.433, June 1981 (Abst. 249).
- LOESCHER, W.H.; FELLMAN, J.K.; FOX, T.C.; DAVIS, J.M.; REDGWELL, R.J.; KENNEDY, R.A. Other carbohydrates as translocated carbon sources: Acyclic polyols and photosynthetic carbon metabolism. In: HEATH, R.L. ; PREISS, J. (eds.). **Regulation of Carbon Partitioning in Photosynthetic Tissue**. Rockville MD: American Society of Plant Physiologists.1985. p.309-332.
- MASUDA, Y. Effects of light on a growth inhibitor in wheat roots. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.780-790, 1962.
- MAY, R.A.; TRIGIANO, R.N. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora* **Journal of American Society Horticultural Science**, Virginia, v.116, n.2, p.366-371, Mar.1991.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiol**, California, v.25, p. 135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco time culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I.K. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I.K. **Cell culture and somatic cell genetics on plant - Cell growth, nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation**, Orlando: Academic Press, 1985. v.2 p. 129-147.
- PICKARD, B.G. Roles of hormones, protons and calcium in geotropism. In: PHARIS, R.P.; REID, D.M. (eds.), **Encyclopaedia Plant Physiology**. New Series. Berlin: PHARIS, R.P.; REID, D.M. (eds.) Springer-Verlag, v.11, 193-281, 1985.
- PIERIK, R. L. M. Plant cell culture tecnology - a book review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam,. v.33, p.308-309, 1987.
- PILET, P. E.; RIVIER, L. Light and dark georeation of maize roots: efects and endogenous level of abscisic acid. **Plant Science Letters**, Elsevier, v.18, p.201-206, 1980.

- PINTO, J.E.B.P.; ARELLO, E.F.; PINTO, C.A.B.P.; BARBOSA, M.H.P. Resposta à regeneração e crescimento de brotos "in vitro" de *Kielmeyera coriacea* quando influenciado por diferentes concentrações dos sais e de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.26, n.1, p.57-61, 1996.
- POSPISILOVA, J.; CATSKY, J.; SOLAROVA, J.; TICHA, I. Photosynthesis of plant regenerants: Specificity of "in vitro" conditions and plant response. **Biologia Plantarum**, Dodrecht, v.29, p.415-421, 1987.
- RODRIGUEZ, R. Stimulation of multiple shoot-bud formation in walnut seeds. **HortScience**, Alexandria, v.17, n.4, p.592, Aug. 1982.
- SHIBLI, R.A.; SMITH, M.A.L.; SPOMER, L.A. Osmotic adjustment and growth responses of three *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Cultivars to osmotic stress induced "in vitro". **Journal of Plant Nutrition**, Montcello, v. 15, n.9, p.1373-1381, 1992.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured "in vitro". In: Bell, E. (ed.). **Molecular and Cellular Aspects of Development**. New York: Harper & Row. 1965. p.481-494.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical Regulation of Growth and Organ Foramtion in Plant tissue Cultured "in vitro" (Biological Action of Growth Substances). **Sympo. Soc. Exp. Biol.** v.11, p.116-131, 1957.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. California: Bejamins/Cummings Publishing Company, 1991. 565p.
- TILLMANN, K.V. On the plant growth hormone produced by *Rhizopus suinus*. **Journal Biol. Chem.** v.107, p.279-291, 1935.
- THORPE, T.A. Physiological and biochemical aspects of organogenesis "in vitro". In: **Frontiers of Plant Tissue Culture**. Calgary: University fo Calgary Printing Services, 1978. 49-58p.
- THORPE, T.A.; PATEL, K.R. Clonal propagation: Adventitious buds. In: VASIL, I.K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants - Laboratory procedures and their applications**. Orlando: Academic Press, 1984. v.1, p.49-60.

- TORREY, J.G. Effects of light on elongation and braching in pea roots. **Plant Physiology** , Denville, v. 27, n.3, p.591-602, July 1952.
- UPRETI, J.; DHAR, U. Micropropagation of *Bauhinia vahlii* wight & Arnott - a leguminous liana. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.16, n.4, p.250-254, Nov./Dec. 1996.
- VASIL, I.K.; HILDERBRANDT, A.C. Grout and chlorophyll production in plant callus tissues grown "in vitro". **Planta**, Berlin, v.68, p.69-82, 1996.
- WELANDER, T. Effects of nitrogen, sucrose, AIA and kinetin on explants of *Beta vulgaris* grown "in vitro". **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.36, p.7-10, 1976.
- WILKINS, M.B. and WAIN, R.L. The root cap control of root elongation in *Zea mays* seedlings to white light. **Planta**., Berlin, v.121, p.1-8, 1974.
- ZENK, M.H.; EL-SHAGI, H.; ARENS, H.; STOCKIET, J.; WEILER, E.W.; DEUS, B. Formation of the indole alkaloids Serpentine and Ajmalisine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* pp.27-43 in Barz et al. (eds.) 1977 (q.v.) 1977.
- ZIMMERMAN, M.H.; ZIEGLER, H. List of sugar alcohols in sieve-tube exudates. In: PIRSON, A.; ZIMMERMAN, M.H. (eds.). **Encyclopedia of Plant Physiology**. Berlin: Springer-Verlag, 1975. v.1, p.480-503 (New Series).
- ZIR, M. "In vitro" handling and acclimatization of time culture plants. In: WHITHERS, L.A.; ALDERSON, P.G. (eds.). **Plant time culture and its agricultural applications**. London: Butterwothes, 1986. P.187-196
- WELANDER, M.; MAHESWARAN, G. Shoot regeneration from leaf explants of dwarfing apple roostocks. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v.40, p.223-228, 1992

CAPITULO IV

ESTUDO COMPARATIVO ANATÔMICO DE PLANTAS DESENVOLVIDAS "IN VITRO" E "IN VIVO"

1- RESUMO

FIDELIS, Iraci. Estudo anatômico comparativo de estruturas vegetativas de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. desenvolvidas "in vitro" e "in vivo". Lavras: UFLA, 1998.109p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia)*.

Brosimum gaudichaudii Tréc. (Moraceae) é uma importante planta considerada medicinal brasileira usada para tratamento do vitiligo. Conhecida popularmente como mama-cadela é uma planta nativa e de difícil propagação tanto por estaca como por sementes (sementes recalcitrante). Reportou-se uma comparação anatômica "in vitro" e "in vivo" dessa planta medicinal. Organizações anatômicas dos tecidos foram diferentes "in vivo" e "in vitro". "In vivo" a seção transversal da folha mostrou uma camada de células de parênquima paliçádico, e duas camadas de células de parênquima lacunoso. "In vitro" o mesofilo consistia de 3-4 camadas de células sem diferença entre elas. O corte transversal do caule "in vitro" mostrou uma quantidade grande de tricomas que "in vivo" não foi formado.

*Comitê Orientador: José Eduardo B.P. Pinto - UFLA (Orientador), Evaristo Mauro de Castro - UFLA, Manuel Losada Gavilanes - UFLA

2- ABSTRACT

FIDELIS, Iraci. Anatomic studies comparative of vegetatives struture of *B. gaudichaudii* Tréc.development "in vitro" and "in vivo". Lavras: UFLA, 1998. 109p. (Dissertation - Masters degree in Agronomy, area of Fitotecnia)*.

Brosimum gaudichaudii Tréc. (Moraceae) is an important brazilian plant considered medicinal commonly used in skin disorder (vitiligo). It is native Brazilian bush called "mama-cadela", and of difficult propagation by cutting or seeds (recalcitrant). It was reported here anatomic comparison "in vitro" and "in vivo" of this medicinal plant. Anatomic organizations of tissues were different "in vivo" and "in vitro". Cross section of a leaf "in vitro" showed one layer of parenchymatous palisade cells and two layers of parenchymatous spongy cells. "In vivo", the mesophyll of the lamina consisted 3-4 layers of cells without format difference among itself. Cross section of stems "in vitro" showed a lot of trichomas that "in vivo" it was not observed.

3- INTRODUÇÃO

Das formações vegetais brasileiras, o cerrado destaca-se por sua extensa área (20% do território) e pelo potencial de exploração de suas espécies nativas. O cerrado cobre uma extensão estimada em 1,3 milhões de quilômetros quadrados, sendo que 80% desta área localiza-se nos estados de Goiás, Mato Grosso e Minas Gerais. Em Minas Gerais cerca de dois terços de área é coberta por cerrados.

Substancial número de plântulas micropropagadas não sobrevivem quando transferidas das condições "in vitro" para a casa de vegetação ou para o

campo. O ambiente de casa de vegetação ou o campo tem uma mais baixa umidade relativa, um mais alto nível de luz e condições ambientais não assépticas que constituem fatores estressantes para as plântulas micropropagadas, comparadas com as condições "in vivo". Muitas espécies desenvolvidas "in vitro" requerem um processo de aclimatização em casa de vegetação para assegurar que um suficiente número de plantas sobreviverão e crescerão vigorosamente quando transferidas para o solo.

A aclimatização não é uma técnica única em micropropagação, mas tem sido usada há anos na propagação convencional. Depois das mudas terem formado raízes em uma bancada de propagação, elas são frequentemente aclimatadas antes da transferência para o campo. Exemplos de duas técnicas comumente utilizadas são a redução gradual da umidade relativa ou a quantidade de nebulização (Hartmann, Keser e Davies, 1990) e a manutenção do nível de luz na casa de vegetação a 50% de sombreamento, antes das plântulas serem transferidas para o campo (Welch, 1970).

Não se sabe como a anatomia de órgãos vegetativos, principalmente de plântulas micropropagadas, são afetadas pelas condições ambientais de cultivo; ou como a anatomia das plantas transplantados são modificadas durante a aclimatização, antes de serem levadas para ambientes de campo. A avaliação de mudança estrutural que ocorre durante a aclimatização é um pré-requisito para a compreensão deste processo de adaptação; e é necessário para o desenvolvimento de um eficiente protocolo para plântulas micropropagadas.

O presente trabalho teve como objetivo descrever aspectos morfológicos e anatômicos de órgãos vegetativos de mama-cadela, desenvolvidos a partir de sementes, em dois diferentes ambientes de cultivo: "in vivo" (casa de vegetação); onde prevalecia uma intensidade luminosa mais alta, presença de ventiladores (vento) e substrato, diferentes daquelas condições "in vitro", onde a irradiância era menor e um meio de cultura como substrato rico em sais

(principalmente nitrato) prontamente disponível. Desta descrição podem-se interpretar as modificações morfo-anatômicas que ocorreram quando as plantas foram transferidas de ambientes "in vitro" para um processo adaptativo de aclimatação (casa de vegetação).

4- REFERENCIAL TEÓRICO

Plantas lenhosas propagadas "in vitro" são frequentemente afetadas por excessiva presença de fatores do meio de cultura que conduzem à degeneração metabólica e morfológica. Desordens anatômicas, morfológicas e fisiológicas nos tecidos de plantas cultivadas "in vitro" tem sido descritas sob diversas terminologias: vitrificação, translucidez, hiperhidratação, suculência e transparência. A vitrificação é uma mistura destes termos, porque ela se refere a processos físicos e não biológicos, dando uma aparência de vidro. As modificações (Debergh e Maene, 1984), manifestadas principalmente nas folhas, afetam os dois principais processos executados pelas folhas, isto é, a fotossíntese e as trocas gasosas (CO_2 , H_2O e vapor). As desordens anatômica são menos extensas no caule e raízes. Estas modificações impedem o estabelecimento "ex vitro" de plantas micropropagadas.

O requerimento especial para a proliferação de brotos "in vitro": alta umidade, superfluxo de fatores nutricionais, ambos mineral e carboidratos, alto nível de reguladores de crescimento e baixa intensidade de luz, são as principais causas encontradas que induzem à má formação de brotos (Ziv, 1986; Gaspar et al., 1987). Evidências indicam que a umidade relativa e o potencial hídrico são os fatores chaves envolvidos na morfogênese "in vitro".

A desorganização no desenvolvimento de meristemas e folhas teve como resultante plantas frágeis, as quais têm aparência de vidro e hiperhidratadas. Muito do mesofilo não organizado consiste de parênquima esponjoso, rico em espaços intercelulares. Em macieira o sistema lacunar estava hiperdesenvolvido,

com volume aumentado acima de cinco vezes, quando comparado a folhas normais (Paques e Boxus, 1987). Em craveiro (*Gypsophila paniculata* L. - Caryophyllaceae) o aumento dos espaços intercelulares foi devido à água extra protoplasmática (Kevers, Prat e Gaspar, 1987). As células em folhas vítreas tinham paredes finas, contendo largamente vacuolizado, citoplasma (Brainerd Fuchigami, 1981; Fabbri, Sutter e Dunston, 1986; Grout e Aston, 1987; Reuther, 1988; Vieitez, Ballester e Vieitez, 1987; Leshem, 1983a). Em *Liquidambar styraciflua* muito dos cloroplastos faltavam uma organização normal do grana dentro do estroma (Wetzstein e Sommer, 1982; 1983; Lee, Wetzstein e Sommer, 1985). Em brotos de craveiro (*Gypsophila paniculata* L.) cultivados em meio líquido, os cloroplastos tinham um grande grão de amido (Ziv e Ariel, 1988). Em ameixeira, craveiro e framboesa, o conteúdo de clorofila foi mais baixo nas folhas vitrificadas do que nas folhas normais (Phan e Letouzé, 1983; Ziv, Meir e Halevy, 1983; Donnelly e Vidaver, 1984a,b).

Wetzstein e Sommer (1982) relatam que folhas de *Liquidambar styraciflua* tinham um menor conteúdo citoplasmático e um pobre desenvolvimento do cloroplasto quando comparado com folhas de árvores crescidas no campo. Os cloroplastos de plantas crescidas "in vitro" estavam achatadas com grana desorganizado e faltavam grânulos de amido. Algumas mudanças na anatomia foliar poderiam ser induzidas pelo nível de luz "in vitro". Quando o nível de luz foi elevado de 50 para 155 ou 315 $\mu \text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, os cloroplastos em folhas de *Liquidambar styraciflua* desenvolveram um grana bem organizada.

Folhas persistentes de plantas de morango tornaram-se mais espessas devido à camada de células paliçádicas (Fabbri, Sutter e Dunston, 1986); mas não havia mudança no seu número ou na quantidade dos espaços do mesofilo. Folhas formadas durante a aclimatização tinham várias camadas paliçádicas. Com o aumento do tempo, folhas mais jovens tornaram-se similares àquelas de

plantas crescidas no campo. O desenvolvimento de novas folhas depois da remoção do meio de cultivo foram considerados como sendo importantes para o crescimento vigoroso das plantas. Durante a aclimatização, folhas presentes, como folhas primordiais "in vitro", assumiram características intermediárias entre folhas crescidas "in vitro" e folhas crescidas em casa de vegetação e no campo. Apenas novas folhas que se formaram completamente depois da remoção do cultivo "in vitro" assemelharam-se às folhas crescidas em casa de vegetação (Grout e Aston, 1978; Wetzstein e Sommer, 1982; Donnelly, Vidaver e Lee, 1985).

Tipicamente, folhas de plantas crescidas em ambientes ensolarados tem uma taxa fotossintética mais alta e são menores, mais pesadas e mais espessas por unidade de área do que plantas crescidas à sombra (Boardman, 1977 e Bjorkman, 1981). O aumento na espessura da folha, especialmente pelo alongamento ou adição de células paliçádicas, está relacionado a uma redução na resistência do mesofilo ao dióxido do carbono (Nobel, 1977) e correlacionado com aumento em fatores potencialmente limitando à fotossíntese (e.g. RuBisco, carregadores de elétrons, condutância estomatal) (Bjorkman, 1981). Chazdon e Kaufman (1993) estudaram duas espécies congênicas de *Piper* e descobriram que a capacidade fotossintética estava correlacionada com a espessura do mesofilo.

Pouca deposição de cera epicuticular nas folhas vitrificadas foram manifestados tanto na quantidade quanto na qualidade das ceras (Grout, 1975; Grout e Aston, 1978; Sutter, 1985; Sutter e Langhans, 1985; Ziv, Meir e Halevy, 1983). Ceras epicuticulares estavam finamente depositadas e significativamente diferentes na composição em folhas vitrificadas quando comparadas às normais.

Reduzida lignificação, paredes celulares finas, grandes espaços intercelulares e tecido vascular reduzido foram observados também em caule vitrificado. Em castanheiro, gerânio e macieira, brotos vitrificados estavam com

diâmetros menores; no caule faltava tecido esclerenquimático e células corticais e medulares estavam hiperhidratadas (Vieitez, et al., 1985). Em plantas de craveiro vitrificadas, fibras procambias não foram observadas e em feixes vasculares faltava uma organização normal (Leshem, 1983a). Em plantas de couve-flor as conexões entre o caule e as raízes estavam incompletas (Grout e Aston, 1977a). Alterações na morfologia foliar podem influenciar processos metabólicos e fisiológicos, associados principalmente à fotossíntese e transpiração. Muitas destas evidências indicam que o estado da água e a fase gasosa durante os vários estágios da cultura são a chave dos fatores envolvidos na desorganização morfológica "in vitro". O ambiente de cultivo pode afetar e conduzir a diferentes atividades enzimáticas, resultando em várias mudanças nos processos metabólicos na planta. Algumas respostas comumente assemelham-se a plantas cultivadas sob condições de estresse.

A células hiper-hidratadas nas folhas vitrificadas atribui-se uma lignificação incompleta (Phan e Letouzé, 1983; Kevers, Prat e Gaspar, 1987). A relação da água nas células das plantas é regulada pelas propriedades plásticas e elásticas da parede celular. Mudanças na biossíntese da celulose e lignina podem alterar a extensibilidade da parede celular, resultando na redução da pressão de turgor da célula (Kevers e Gaspar, 1985a; Kevers, Coumans e Coumans-Gilles, 1984; Phan e Letouzé, 1983). Isto pode conduzir a mudanças no potencial hídrico, aumentando a água considerada e como resultado, a hiper-hidratação do tecido (Gaspar et al., 1987). Excesso de produção de etileno pelos tecidos da planta está associado à várias condições estressantes (Yang e Hoffman, 1984). Cultura de brotos, uma vez cortados e cultivados "in vitro", é também exposta a um estresse, pela submersão em um meio líquido, pela condensação da água ou pela exposição à alta umidade relativa (90-100%) em culturas fechadas, condições que são análogas ao alagamento. Estas condições podem explicar o alto nível da evolução de etileno das plantas vitrificadas (Hakkaart e Versluijs,

1983; Kevers et al., 1984; Kevers e Gaspar, 1985b; Ziv e Ariel, 1988). Hipolignificação foi atribuída a baixo nível de fenol e inadequada atividade da enzima hidroxí-cinâmico Co-A ligase (Phan e Letouzé, 1983).

Plantas cultivadas "in vitro" são heterotróficas ou mixotróficas devido à falta de um ativo sistema fotossintético e à baixa ou inadequada atividade de enzimas fotossintética (Grout e Aston, 1977b; Grout e Donkin, 1987). A baixa atividade metabólica associada à fotossíntese e à assimilação de carboidratos é, provavelmente, resultado da presença de alto nível de sacarose no meio, assim como a baixa intensidade de luz durante o cultivo "in vitro" (Capellades et al., 1990; Kozai, Oki e Fujiwara, 1987). A fixação do dióxido de carbono em couve-flor e plantas de morango foi mais baixa quando comparada à plântulas "in vitro" e plantas crescidas em casa de vegetação (Grout e Aston, 1987b; Donnelly e Vidaver, 1984b). A redução da atividade da reação de Hill foi também relatada (Grout e Aston, 1977b). Em relato mais recente Grout e Donkin (1987) estudaram o aparato fotossintético e as atividades na cultura de meristema de couve-flor. Embora adequado, tão bem quanto o sistema de transporte de elétrons, as folhas tinham uma menor atividade da ribulose difosfato carboxilase, resultando em uma baixa assimilação de carbono.

A desordem estrutural nas plantas "in vitro" relacionadas anteriormente, é resultado de complexos e múltiplos fatores no meio de cultura, que induz a desordem estrutural e funcional das folhas. A consequência é uma baixa taxa de sobrevivência das plantas depois de transferidas "ex vitro". A compreensão dos vários fatores do meio de cultura é importante. O conhecimento destes fatores pode fornecer instrumentos para o controle da morfogênese de plantas "in vitro", anterior à transferência para a casa de vegetação (Short et al., 1985; Ziv, 1986).

5- MATERIAIS E MÉTODOS

Sementes de mama-cadela foram coletadas no município de Lavras - MG, de plantas crescendo no campo (Região de Cerrado) e cultivadas "in vitro" e "in vivo" (Figura 4-1 A e B).

"In vivo", as sementes foram cultivadas em casa de vegetação do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizados vasos plásticos com capacidade para 5 litros, contendo como substrato a mistura de compostagem latossolo vermelho e areia fina lavada, na proporção 2:1:1. A irrigação foi feita pelo sistema de nebulização intermitente. Após germinarem, as sementes receberam irrigação uma vez por semana, sendo retirada a tela plástica que as cobriam até então. A temperatura na casa de vegetação ficou ao redor de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Quando as plântulas atingiram uma altura de 15 cm (parte aérea), ocorrido aos 4 meses, foram utilizadas para estudos anatômicos.

"In vitro", as sementes foram desinfestadas em solução comercial contendo 2% de hipoclorito de sódio por 10 minutos, sob agitação e lavadas quatro vezes em água esterilizada e autoclavadas. Depois retiraram-se os tegumentos e inocularam-nas em meio de Murashige e Skoog (Murashige e Skoog, 1962), solidificado com 0,6% de agar, sem suplementação de qualquer regulador de crescimento. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,6 \pm 0,1$ antes da autoclavagem.

As sementes foram inoculadas a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 8 semanas em um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro sob $25 \mu\text{mol.m}^{-1}\text{s}^{-1}$ de irradiância. Após as 8 semanas, as plântulas foram utilizadas para estudos anatômicos.

Os materiais botânicos: raiz, caule e folhas foram fixado em F.A.A. 70% (Johansen, 1940) por 72 horas e posteriormente conservado em álcool 70^oGL.

Lâminas permanentes de raiz, caule e folhas foram preparadas com as técnicas usuais de inclusão em parafina após desidratação em série alcoólica-etfílica (Johansen, 1940; Sass, 1951). Foram efetuados cortes histológico em micrótomo e à mão livre, "in vitro" e "in vivo", em raiz, caule e folhas, na seguintes regiões:

1- Raiz: 0,5 cm abaixo do coleto e na porção mediana.

2- Caule: 0,5 cm acima do coleto e 0,5 cm abaixo do primeiro e segundo entrenós.

3- Folha: corte feito na região mediana, entre a borda e a nervura mediana.

Raiz, caule e folhas foram seccionados com auxílio de micrótomo rotatório em séries, orientados transversalmente e submetidos ao processo de coloração com safrablau (safranina-azul de astra) (Bukatsh, 1972). Foram efetuados também cortes à mão livre com auxílio de lâmina de barbear e inclusão do material em isopor, sendo estes submetidos à clarificação em solução de hipoclorito de sódio a 50% (Handro, 1964) com posterior lavagem em água destilada. Em seguida, a desidratação e coloração com safranina e fast green foi efetuada, conforme roteiro: Álcool 50% 10 min., álcool 60%, 70% safranina 15 min, 80%, 90% e 100% por 10 minutos cada, depois em fast green por 2 a 3 minutos, álcool-xilol 3:1, 1:1, 1:3, xilol, xilol por 10 min..

Após a desidratação, as lâminas foram montadas com Bálsamo sintético do Canadá, postas para secar e observadas ao microscópio.

Microscopia Eletrônica

Os explantes foram submetidos a uma preparação para serem fotografados com o auxílio de microscópio eletrônico de varredura. Esta preparação consistiu dos seguintes passos: fixação dos explantes por meio de

Glutaraldeído 3%, em solução tampão de pH 7.4 (preparado de Fosfato de Potássio a 0,1) durante 12 horas em ambiente resfriado (geladeira); lavagem dos explantes com a solução tampão durante 15 minutos; posteriormente, os explantes foram fixados com Tetróxido de Ósmio a 1%, na solução tampão por aproximadamente 2 a 4 horas; em seguida foram novamente lavados com a solução durante 15 minutos; a seguir, foram desidratados em solução de acetona a 30, 50, 70, 80, 90, 100, 100 e 100% durante 15 minutos em cada uma destas concentrações (em geladeira); após a desidratação, os explantes foram colocados em clorofórmio puro durante 12 horas em geladeira; finalmente os explantes foram secos em temperatura ambiente, montados e metalizados.

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Folhas

As diferentes condições ambientais "in vitro" e "in vivo" podem ter contribuído para as diferenças observadas na estrutura foliar.

Num corte transversal da nervura central, na parte mediana da folha, vê-se que a organização anatômica dos tecidos "in vitro" é diferente daquelas "in vivo". Nota-se, "in vivo", uma estrutura dorsiventral. A epiderme da face adaxial é formada por uma camada de células e intercaladas por tricomas simples e secretores. O mesofilo apresenta o parênquima paliçádico constituído de uma camada de células; o parênquima lacunoso, compactado, apresenta duas camadas de células (Figs. 4-2). "In vitro", a epiderme da face adaxial também apresenta uma camada de células com tricomas simples e secretores, porém mais elevado em relação a "in vivo". "In vitro", o mesofilo apresenta de 3-4 estratos de células, sem diferenças no formato (Fig. 4-3).

Na região mediana da nervura central, "in vivo", a epiderme da face abaxial é formada por células de diferentes tamanhos e formato retangular.

Anexo à epiderme abaxial, observam-se os agrupamentos colenquimáticos do tipo angular. Cada agrupamento é constituído por 3-4 estratos de células (Figs.4-4 A e B). "In vitro", a epiderme da face abaxial é formada por células com tamanho uniforme e formato retangular. Neste caso, observou-se somente uma camada de tecido colênquimatoso (Figs.4-5 A e B).

Estas diferenças observadas na folha "in vivo"; estrutura dorsiventral, além da presença de colênquima, tornando a folha mais espessa, podem estar realmente ligadas ao processo adaptativo, uma vez que estas diferenças conferem à folha uma maior sustentação e plasticidade.

O exame da seção histológica, preparado para microscopia eletrônica, revelou que as folhas de plantas crescidas "in vitro" apresentaram-se menos espessadas, tinham um pobre desenvolvimento da camada paliçádica com um significativo espaço de ar no mesofilo, quando comparada às plantas da casa de vegetação.

Resultados semelhantes foram obtidos em várias outras espécies, como o ocorrido em plântulas micropropagadas de couve-flor (Grout e Aston, 1978) e *Liquidambar styraciflua* (Wetzstein e Sommer, 1982) as quais não desenvolveram uma definida camada paliçádica "in vitro". Folhas de brotos micropropagados de ameixeira tinham apenas uma camada de células paliçádicas com 2 a 3 camadas e um grande espaço de ar no tecido mesofilo, comparado com folhas de plantas de casa de vegetação ou crescidas no campo (Brainerd e Fuchigami, 1981). Entre outras espécies nas quais apenas uma camada de células paliçádicas foi formada "in vitro" inclui framboesa (Donnelly e Vidaver, 1984a), e morango (Fabbri, Sutter e Dunston, 1986). Em geral a camada paliçádica foi mais curta e as células careciam de aparência alongada, característica de células paliçádicas em casa de vegetação ou crescidas no campo.

James e Newton (1977), também cita que folhas de soja cultivadas em intensidade de luz mais alta ($850 \mu\text{einsteins.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e à baixa intensidade ($250 \mu\text{einsteins.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) diferiram significativamente na anatomia foliar. Folhas desenvolvidas à mais alta intensidade de luz foram mais espessas, apresentando duas camadas de tecido paliçádico. Além da maior espessura do mesofilo, causado pela alongação ou adição de células paliçádicas, notaram-se diferenças nos fatores limitantes da fotossíntese.

Ocorreram poucos tricomas filiformes na superfície abaxial das folhas de framboesa crescidas "in vitro" comparadas em contrapartida às crescidas em casa de vegetação (Donnelly e Vidaver, 1984a). Pecíolos de plantas de bétulas que desenvolveram "in vitro" careciam de colênquima, quando comparado àqueles de plantas crescidas no campo (Donnelly, Vidaver e Lee, 1985). Tecidos vasculares das folhas micropropagadas de bétula tinham número reduzido de nervuras, se comparados às folhas de plantas crescidas em casa de vegetação (Smith, Palta e McCown, 1986).

Caule

Nas seções do caule, 0,5 cm acima do coleto em "vivo", observou-se um revestimento primário com epiderme uniestratificada, sem presença de tricomas (Figs.4-6 A e B). "In vitro", a epiderme apresentou numerosos tricomas, simples e secretores (Fig.4-7, A B, C e D).

A região cortical "in vivo" apresentou células parenquimatosas com formato alongado no sentido periclinal, contendo agrupamento de esclerênquima (Figs.4-8 A); também apresentou inclusões de mono cristais (Fig. 4-8 B). "In vitro", apresentou células parenquimáticas irregulares e de formato arredondado; não foi observado agrupamento de esclerênquima.

Donnelly, Vidaver e Lee, (1985) citam que plântulas de framboesa crescidas "in vitro" apresentavam menor diâmetro e tinham consideravelmente menor quantidade de tecidos de suporte, colênquima e esclerênquima do que plântulas que foram crescidas no campo.

Raiz

Observou-se "in vitro" a existência de dois tipos de raízes: a adventícia, formada em segmentos nodais após a indução com pH de 3,5 e 1,0 mg/L de IBA e raízes desenvolvidas a partir da germinação "in vivo" de sementes imaturas.

A região cortical é formada por células heterodimensionais com pequenos espaços intercelulares. A camada mais interna é formada por uma endoderme com células alongadas transversalmente.

A região vascular é delimitada pelo periciclo o qual é formado por uma camada de células heterodimensionais (Fig. 4-9 A). Anexo a este, ocorre 4 pólos de xilema alternado com floema.

Estrutura secundária da raiz "in vivo"

Nas seções transversais da região mediana da raiz "in vivo", observou-se, em estrutura secundária, a formação de um felogênio subepidérmicamente. O parênquima cortical apresentou células heterodimensionais contendo numerosos monocristais (Fig. 4-9 B). A região vascular caracteriza-se por apresentar crescimento secundário em que se observa floema e xilema secundários numerosos que se encontram em fileiras radiais. Ao lado destes, ordenam-se fileiras de fibras lenhosas e raios medulares cujas células apresentam monocristais.

Donnelly, Vidaver e Lee (1985), relatam que raízes de plântulas crescidas "in vitro" apresentaram-se com menor diâmetro, coberta com pelos radiculares e tendo muito menos periderma do que raízes de framboesa crescidas no campo.

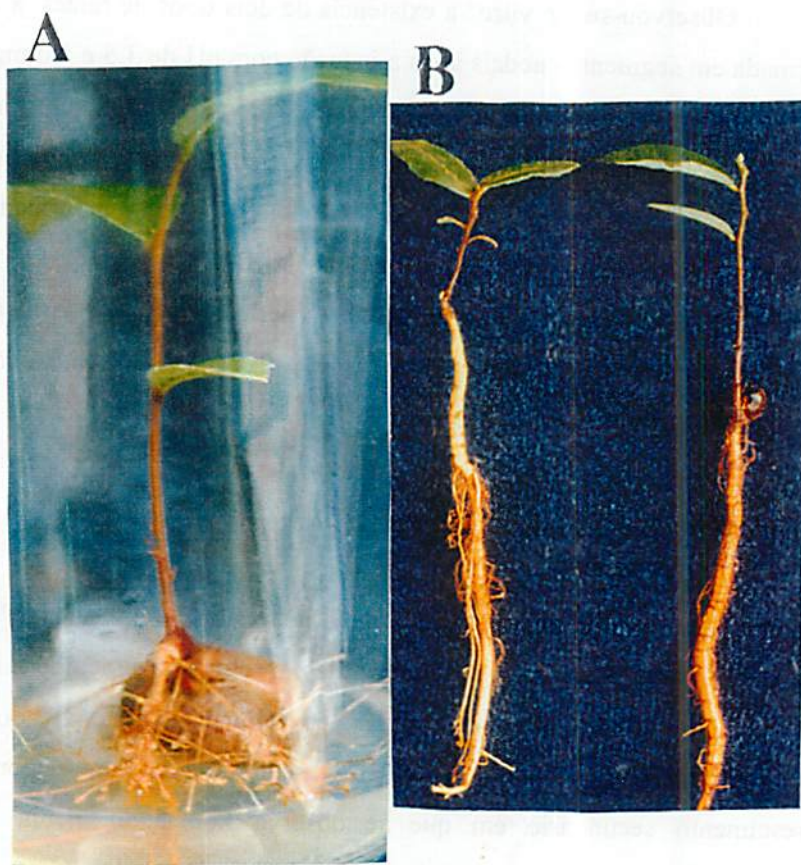


FIGURA 4-1 Aspectos das plantas utilizadas para comparações anatômicas. A- planta "in vitro" e B- plantas "in vivo" (casa de vegetação).

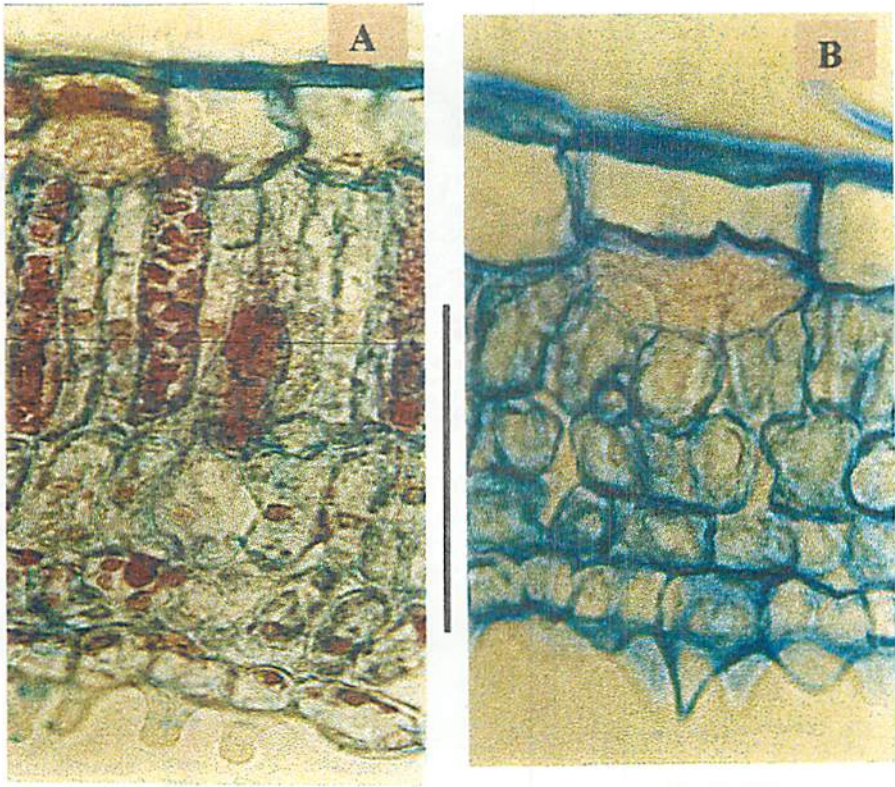


FIGURA 4-2 Seção transversal da lâmina foliar de mama-cadela "in vivo" e "in vitro" A e B. Aspecto geral do mesofilo na região media. Barra = 50 μ m.

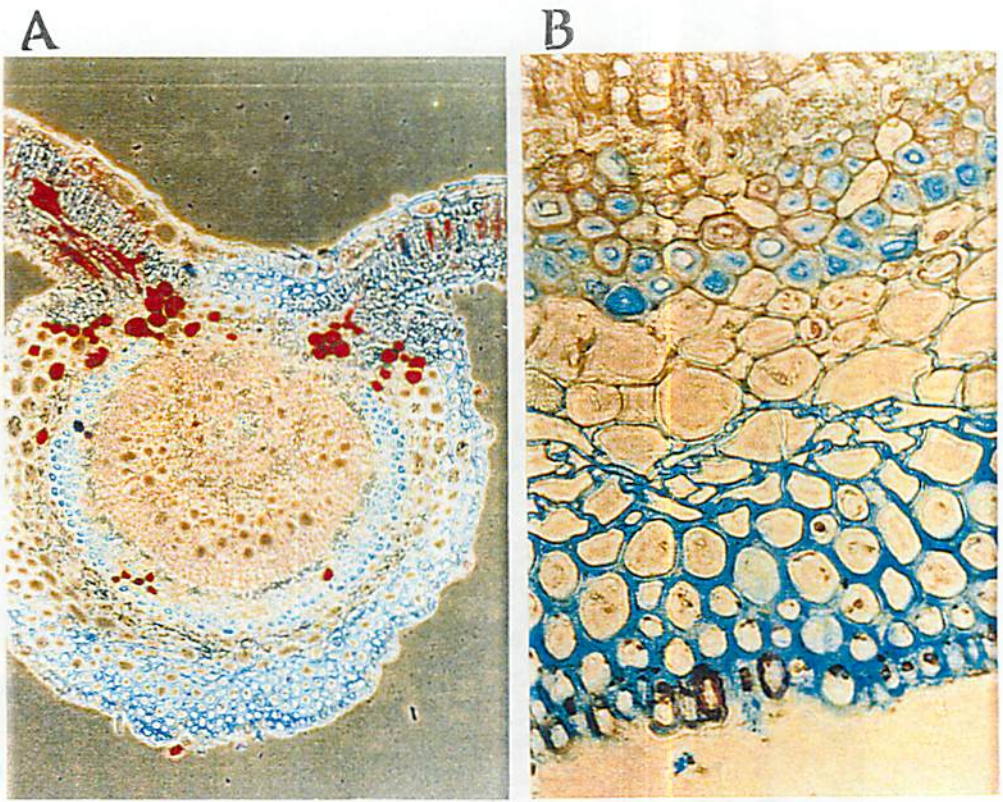


FIGURA 4-3- A seção transversal da nervura central da folha de mama-cadela "in vivo" e B - detalhe da epiderme abaxial. Barras = 50 μ m.

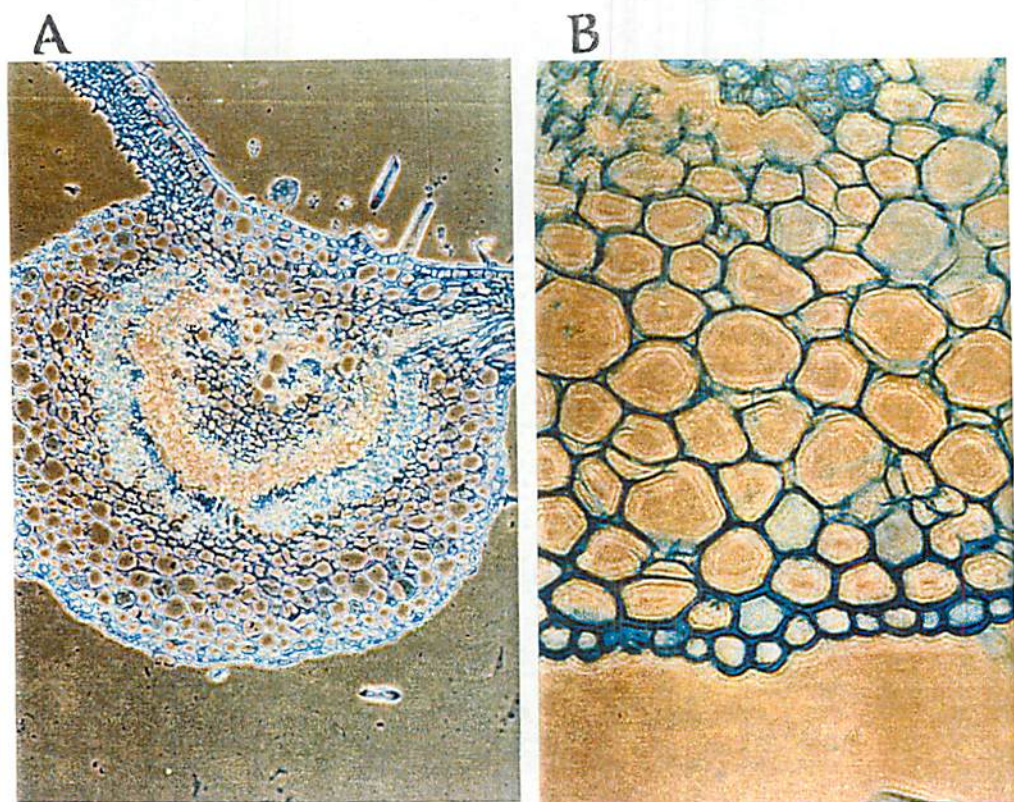


FIGURA 4-4- Seção transversal da nervura central da folha de mama-cadela "in vitro". A- Aspecto geral da região mediana e B- detalhe da epiderme abaxial. Barra = 50 μ m.

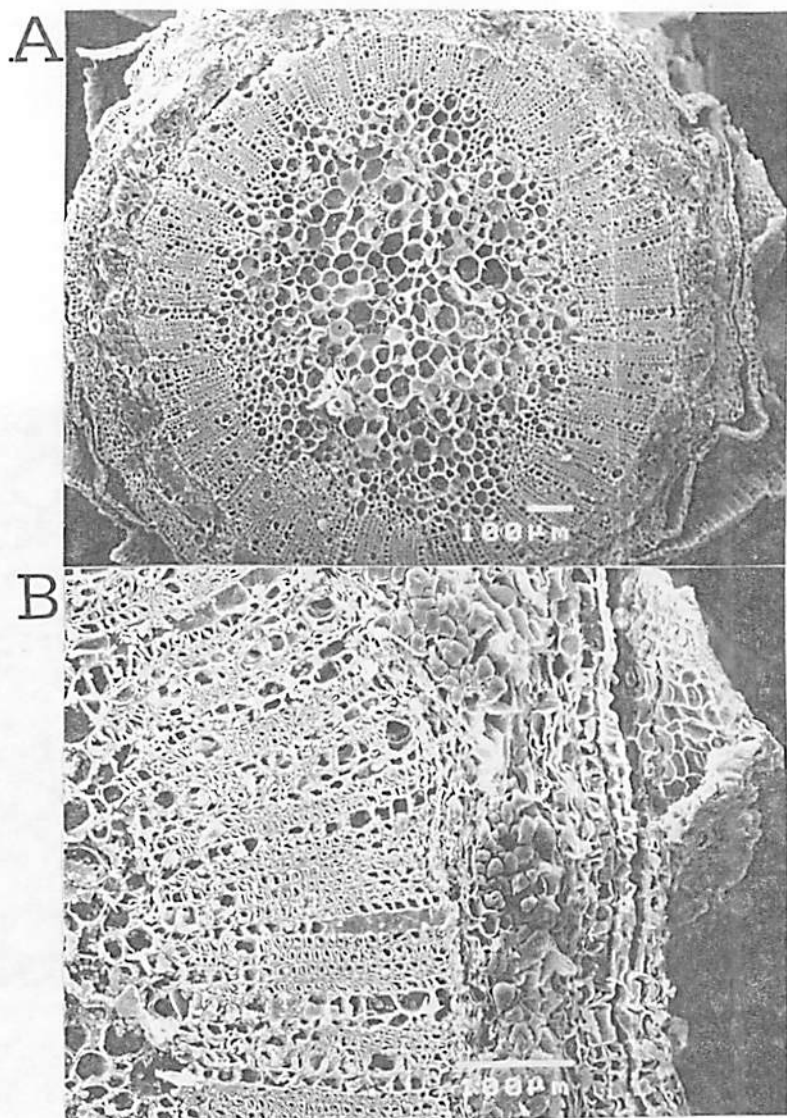


FIGURA 4-5- Seção transversal do caule de mama-cadela "in vivo" a 0,5 cm acima do coleto. A- aspecto do cilindro vascular e B- região da epiderme. Barra = 100 µm.

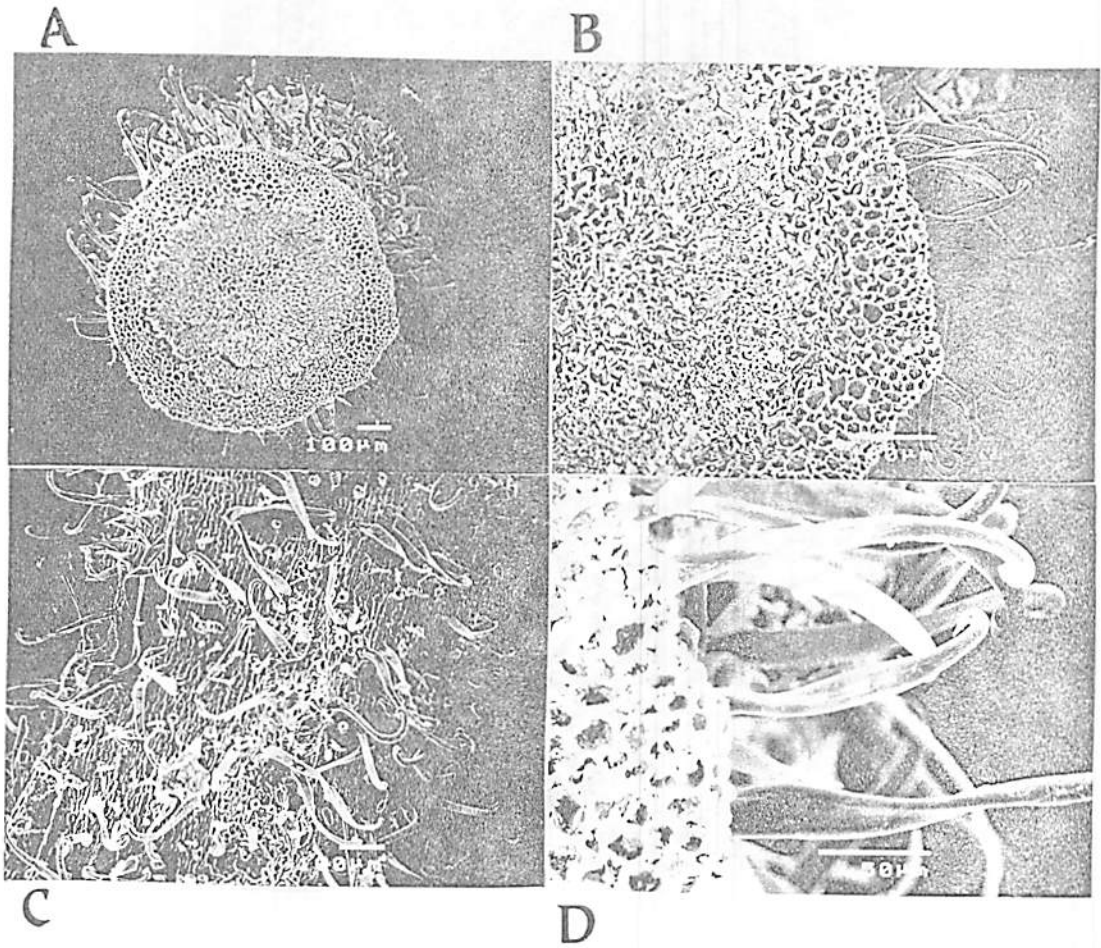


FIGURA 4-6- Seção transversal do caule de mama-cadela "in vitro" a 0,5 cm acima do coleto. A - aspecto do cilindro vascular. B- detalhe da região da epiderme e C e D- detalhe dos tricomas. Barra = 100 μm a, b e c e 50 μm d.

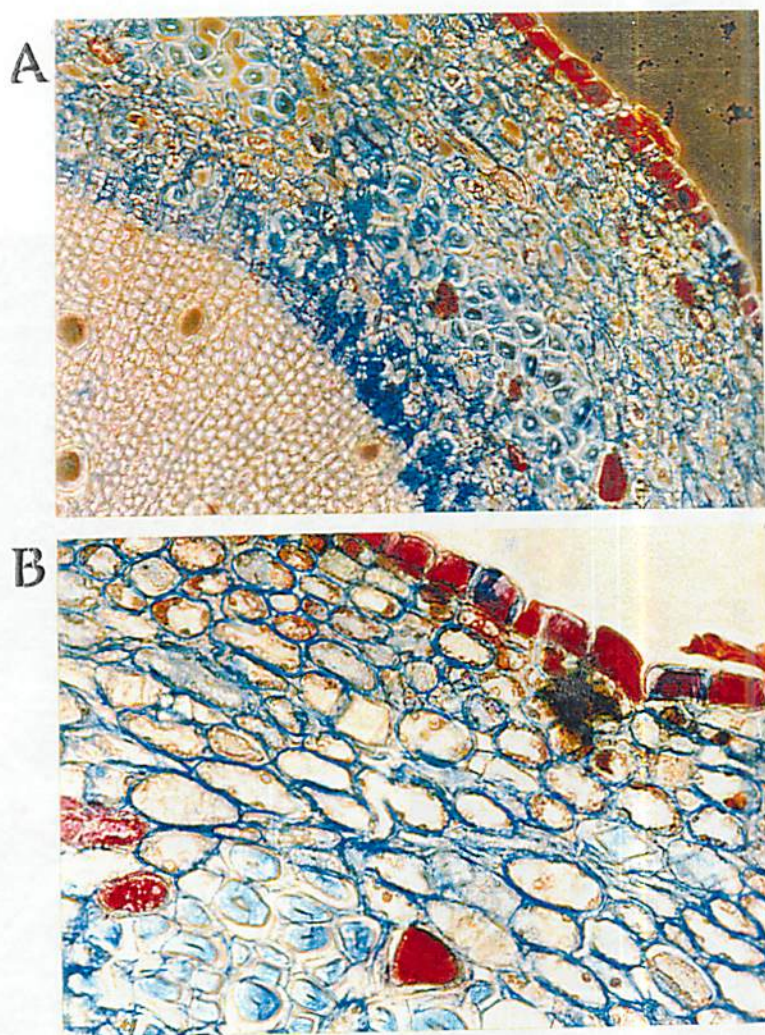


FIGURA 4-7- Seção transversal do caule de mama-cadela "in vivo" a 0,5 cm acima do coleto. A- aspecto geral. B- detalhe do parênquima cortical, Ep. Epiderme, Esc. Esclerênquima, Pco. Parênquima cortical, Mc. Mono-cristais e F. floema. Barra = 50 μ m.

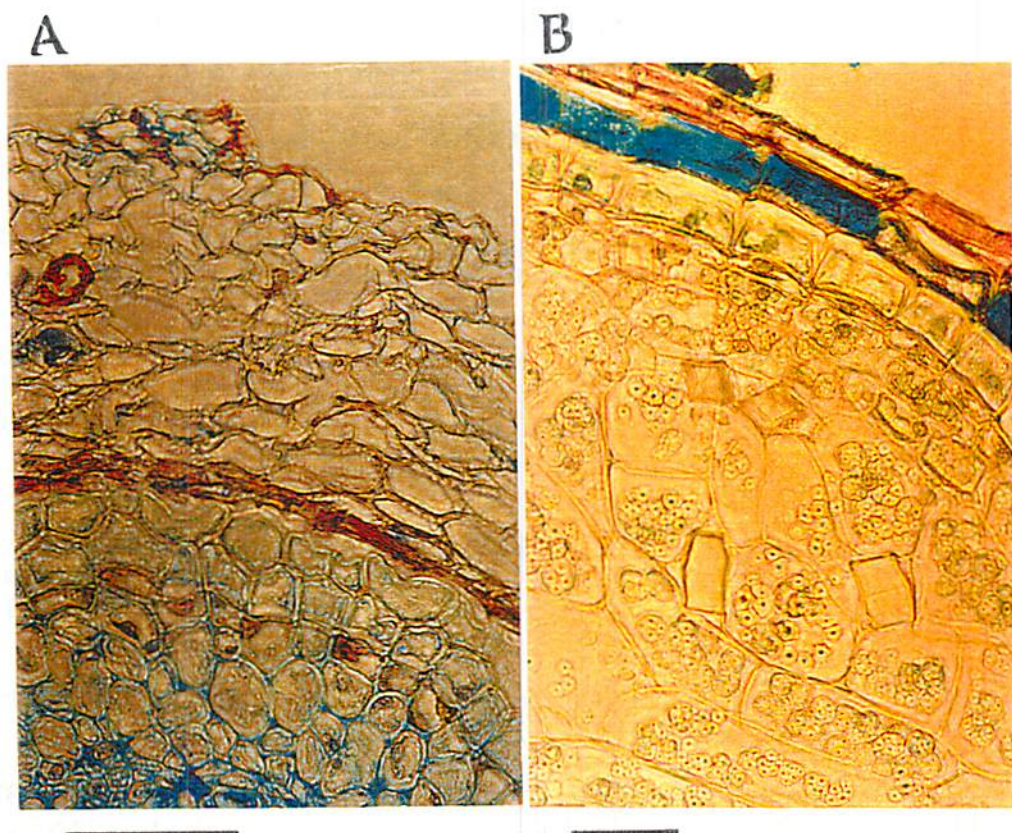


FIGURA 4-8- Seção transversal da raiz de mama-cadela. A- Aspecto geral da região mediana, "in vitro", em endoderme com estrias de caspary, pco parênquima cortical e p pecíolo. B- Detalhe da região cortical "in vivo". Barra = 50 μ m.

7- CONCLUSÕES

Com base nos aspectos anatômicos estudados sobre a espécie mamacadela, as estruturas desenvolvidas "in vitro" e "in vivo" apresentaram organizações anatômicas diferentes. Observou-se também um número mais elevado de tricomas simples e secretores no caule "in vitro". "In vivo" foi observado um número maior de camadas de tecido colenquimatoso.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOARDMAN, N.K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. **Annual Review of Plant Physiology**, California, v.28, p.355-377, 1977.
- BJORKMAN, O 1981. Responses to different quantum flux densities. *In*: LANGE, O.L.; NOBEL, P.S.; OSMOND, C. B.; ZIEGLER, H. **Encyclopedia of plant physiology new series**. Berlin: Springer-Verlag. 1981, n.12a, p.57-107.
- BRAINERD, K.E., FUCHIGAMI, L.H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity, **Journal American Society Horticulture Science**, Alexandria, v.106, n.4, p.515-518, July 1981.
- BUKATSH, F. Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablau-safranina. **Microkosmos**, v.61, p. 255, 1972.
- CAPELLADES, M.; VANDERSCHAEGHE, A.; LEMUER, R.; DEBERGH, P. How important is photosynthesis in micropropagation? *In*: SANGWAN R.S.; SANGWAN-NORREEL, B.S. (eds.). **The Impact of Biotechnology in Agriculture**. Kluwer Dordrecht: Academic Publs, 1990. P.
- CHAZDON, R.L.; KAUFMAN, S. Plasticity of leaf anatomy of two rain forest shrubs in relation to photosynthetic light acclimation. **Functional Ecology**, Oxford, v.7, p.385-394, 1993.

DEBERGH, P.C. (1987) Improving micropropagation, IAPTC Newsletter 51:2-10.

DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. Pathological and physiological problems related to "in vivo" culture of plant, **Parasitica**, Gembloux, v.40, p.69-75, 1984.

DONNELLY, D.J.; VIDAVER, W.E. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil, **Journal of American Society for Horticulture Science**, Alexandria, v.109, n.2, p. 172-176, Mar.1984a.

DONNELLY, D.J.; VIDAVER, W.E. Pigment content and gas exchange of red raspberry "in vivo" and ex vitro, **Journal of American Society for Horticulture Science**, Alexandria, v.109, n.2, p.177-181, Mar. 1984b.

DONNELLY, D.J.; VIDAVER, W.E.; LEE, K.Y. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil, **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 4, p. 43-50, 1985.

FABBRI, A.; SUTTER, E.; DUNSTON, S.K. Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture, **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v.28, p. 331-337, 1986.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; DEBERGH, P.; MAENE, L.; PAQUES, M.; BOXUS, P. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (eds.) **Cell and Tissue Culture in Forestry**, Dordrecht: Martinus Nijhoff Publ, 1987. v.1, p.152-166.

GROUT, B.W.W. Wax development on leaf surface of *Brassica oleracea botrytis* cv Currawon regenerated from meristem culture, **Plant Science Letters**, New York, v.5, p. 401-405, 1975.

GROUT, B.W.W.; ASTON, M.J. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration, **Horticultural Research**, Edinburgh, v.17, p. 1-7, 1977a.

GROUT, B.W.W.; ASTON, H. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture II. Carbon dioxide fixation and the development of photosynthetic ability, **Horticultural Research**, Edinburgh, v.17, p. 65-71, 1977b.

- GROUT, B.W.W.; ASTON, M.J. Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture, *Annal Botany*, London, v.42, p. 993-995, 1978.
- GROUT, B.W.W.; DONKIN, M.E. Photosynthetic activity of cauliflower meristem culture "in vivo" and at transplanting into soil, *Acta Horticulture*, Leuven, v.212, p. 323-327, 1987.
- HAKKAART, F.A.; VERSLUIJS, J.M.A. Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures, *Netherlands plants of plant pathology*. Netherlands, v.89, p.47-53, 1983.
- HARTMANN, H.T.; KESER, D.E.; DAVIES, F.T. Jr *Plant Propagation Principles and Practices*, 5 ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990. p.
- HANDRO, W. Contribuição ao estudo da venação e anatomia foliar das Amarantáceas dos Cerrados. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* Rio de Janeiro, v.36, n.4, p. 479-499.
- JAMES, D.J.; NEWTON, B. Auxin; cytokinin interactions in the "in vitro" micropropagation of strawberry. *Acta Horticulture*, Leuven, v.78, p.321-331, 1977.
- JOHANSEN, B.A. *Plant microtechnique*. New York: Mc Graw-Hill, 1940. 523p.
- KEVERS, C.; COUMANS, M.; COUMANS-GILLES, M.F.; GASPAR, T. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured "in vivo", *Physiology Plant*, Copenhagen, v. 6, n.1, p. 69-74, May 1984.
- KEVERS, C.; GASPAR, T. Soluble, membrane and wall peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase, and lignin changes in relation to vitrification of carnation tissues cultured "in vivo", *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, v.118, p. 41-48, 1985a.
- KEVERS, C.; GASPAR, T. Vitrification of carnation "in vivo": changes in ethylene production, ACC level and capacity to convert ACC to ethylene, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, Dordrecht, v.4, p. 215-223, 1985b.
- KEVERS, C.; PRAT, R.; GASPAR, T. Vitrification of carnation "in vivo": changes in cell wall mechanical properties, cellulose and lignin content, *Plant Growth Regulation*, Dordrecht, v.5, p. 59-66, 1987.

- KOZAI, T.; OKI, H.; FUJIWARA, K. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under higher photosynthetic photon fluxes on growth of tissue-cultured *Cymbidium* plantlets during the preparation stage. In: DUCATÉ, G.; JACOB, M.; SIMEON, A. (eds.) **Plant Micropropagation in Horticultural Industries**. Liège: Press Universitaires, 1987. P.47-54.
- LEE, N.; WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER, H.E. Effect of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedling of *Liquidambar styraciflua* L towards improved acclimatization and field survival, **Plant Physiology**, Denville, v.78, n.3, p. 637-641, July 1985.
- LESHEM, B. Growth of carnation meristems "in vivo": anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation, **Annal Botany**, London, v.52, n.3, p.413-415, Sept. 1983.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NOBEL, P. S. Internal leaf area and cellular CO₂ resistance: photosynthetic implications of variations with growth conditions and plant species. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.40, p.137-144, 1977.
- PAQUES, M.; BOXUS, P. Vitrification: a phenomenon related to tissue water content, **Acta Horticulture**, Leuven, v.212, p.245-252, 1987.
- PHAN, C.T.; LETOUZÉ, R. A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents and of hydroxycinnamate: CoA ligase activity of normal and vitreous plants (*Prunus avium* L.) obtained "in vivo", **Plant Science Letters**, Elsevier, v.31, n.1983, p.323-327, 1983.
- REUTHER, G. Comparative anatomical and physiological studies with ornamental plants under "in vivo" and greenhouse conditions, **Acta Horticulture**, Leuven, v.226, p.91-98, 1988.
- SASS, J. **Botanical microtechnique** - Iowa: Iowa College Press, 1951. 228p.
- SMITH, M.A.L.; PALTA, J.P.; McCOWN, B.H. (1986) Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedling, and greenhouse-grown Asian white birch, **Journal of American Society for Horticultural Science**, Virginia, v.111, n.3, p.437-442, May 1988.

- SHORT, K.C.; WARDLE, K.; GROUT, B.W.W.; SIMPKINS, I. "In vivo" physiology and acclimatization of aseptically cultured plantlets. In: NOVAK, F.J.; HAVEL, T.; DOLEZEL, K. (eds.) **Proc Intl Symp Plant Tissue Culture Application for Crop Improvement**. Olomouc: Czechoslovakia, 1985. p.475-486.
- SUTTER, E.G. Morphological, physical and chemical characteristics of epicuticular wax on ornamental plants regenerated "in vivo", **Annal Botany**, London, v.55, n.3, p.321-329, Mar. 1985a.
- SUTTER, E.G.; LANGHANS, R.W. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture, **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v.60, n.12, p.2896-2902, Dec. 1985b.
- VIEITEZ, A.M.; BALLESTER, A.; SAN-JOSE, M.C.; VIEITEZ, E. Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated "in vivo", **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 65, n.2, p.177-184, Oct. 1985.
- VIEITEZ, A.M.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, E. Vitrification in chestnut shoots regenerated "in vivo", **Acta Horticulture**, Leuven, v.212, p.231-234, 1987.
- WELCH, H.J. **Mist Propagation and Automatic Watering**. Faber and London: Faber, 1970. p.
- WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER, H.E. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization, **American Journal Botany**, New York, v.69, n.10, p.1579-1586, Nov./Dez.1982.
- WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER, H.E. Scanning electron microscopy of "in vivo"-cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization, **Journal American Society Horticulture Science**, Alexandria, v.108, n.3, p.475-480, May 1983.
- YANG, S.F.; HOFFMAN, N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants, **Annual Review of Plant Physiology**, California, v.35, p.155-189, 1984.
- ZIV, M. (1986) "in vivo" hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: WITHERS, L.A.; ALDERSON, P.G. (eds.) **Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications**. London: Butterworths, 1987. p.187-196.

ZIV, M.; ARIEL, T. (1988) The relationship between cell wall deformity and stomatal malfunction in the leaves of carnation "in vivo". In: Proc Intl Soc Plant Molecular Biol, Congress, Jerusalem: 425.

ZIV, M.; MEIR, G.; HALEVY, A.H. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets "in vivo", **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v.2, p.55-60, 1983.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dificuldade de enraizamento de estacas obtidos de segmento de caule, a presença do princípio ativo na raiz (representado a sua extração o sacrifício da planta) a contínua ocupação e exploração extrativista do cerrado e sendo as sementes recalcitrantes, devem conduzir trabalhos no sentido de preservação da espécie *Brosimum gaudichaudii* para evitar a sua extinção.

O florescimento e frutificação da espécie ocorre durante todo o ano segundo a literatura. Em Lavras-MG, foi observado entre os meses de outubro a dezembro. As gemas retiradas destas plantas, que serviram como matrizes, após uma semana de inoculadas estavam todas infectadas por bactérias endógenas e/ou necrosadas, apesar de vários tratamentos com antioxidantes e floroglucinol e diminuição da sacarose e pH da meio. Em vista disto, conduziu-se à utilização de sementes como fonte de explantes para a micropropagação, apesar da variabilidade entre clones de sementes distintas.

Obteve-se um número considerável de brotações de uma única semente com o contínuo crescimento e repicagem também de uma semente apenas. Quanto a indução de brotações com utilização de TDZ, tanto em segmentos nodais quanto em sementes imaturas não resultou em um aumento no número das brotações, havendo sim uma redução no seu tamanho. Para contornar estes e outros problemas (variações somaclonal), explantes deveriam ser induzidos a uma mais baixa concentração efetiva de TDZ e mantidas em meio com TDZ o mínimo de tempo possível. Geralmente, não se recomenda a exposição do tecido ao TDZ por mais que oito semanas.

Os tratamentos com AIB (250 a 2000 ppm) para o enraizamento em estacas de caule não ocorreram na época feita. As estacas foram tratadas com 5 diferentes cepas de *Agrobacterium spp.* em solução líquida e o enraizamento não ocorreu. A formação de gemas em raízes, como em outras raras espécies,

ocorreu com mama-cadela. As estacas vindas de raízes cresceram consideravelmente em bandejas contendo areia em casa de vegetação sob nebulização, assim, não houve formação de raízes.

"In vitro", quando se utilizou de meio MS líquido diluído com baixo pH e adicionado de AIB ocorreu o enraizamento, apesar de não ter sido significativo. Já a indução da rizogênese com utilização de *Agrobacterium spp.* como "in vivo" não ocorreu. Desta forma, novos tratamentos devem ser feitos para que se consiga a formação de um considerável número de raízes em explantes micropropagados, como a formação em estacas.

Quanto aos aspectos anatômicos, observou-se a ocorrência de diferenças quanto a origem das plantas; se de casa de vegetação ou micropropagadas. Falta entretanto fazer mais estudo detalhado, contagem de estômatos, testes citoquímicos assim como comparar com plantas que se encontram no campo para compreender os processos que ocorrem na aclimatização das plantas micropropagadas e a comprovação ou não do princípio ativo.