

**PROPAGAÇÃO E CALOGÊNESE IN VITRO
EM ERVA-DE-TOURO (*Tridax procumbens* L.),
UMA PLANTA MEDICINAL**

ESTER SOLANGE CERQUEIRA

1999



47759
335201FN.

ESTER SOLANGE CERQUEIRA

**PROPAGAÇÃO E CALOGÊNESE IN VITRO
EM ERVA-DE-TOURO (*Tridax procumbens* L.),
UMA PLANTA MEDICINAL**

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

Orientador

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
1999

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

Cerqueira, Ester Solange

**Propagação e calogênese in vitro em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.),
uma planta medicinal / Ester Solange Cerqueira. -- Lavras : UFLA, 1999.**

81 p. : il

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

**1. Erva-de-touro. 2. *Tridax procumbens*. 3. Planta medicinal. 4. Micropropagação. 5.
Calogênese. 6. Planta herbácea. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título**

CDD-633.88355

-583.5504165

ESTER SOLANGE CERQUEIRA

**PROPAGAÇÃO E CALOGÊNESE IN VITRO
EM ERVA DE TOURO (*Tridax procumbens* L.)
UMA PLANTA MEDICINAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 13 agosto de 1999

Prof. Dra. Iara Alvarenga Mesquita Pereira UFLA

Prof. Dr. Luciano Paiva UFLA


Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
1999

A DEUS, criador do céu e da terra,

DEDICO.

**Aos meus pais, Antônio Cerqueira e
Ladir Maria Cerqueira,**

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo.

À Universidade Federal de Lavras, através do Departamento de Biologia (Setor Fisiologia Vegetal), pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À FAPEMIG e CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor e amigo Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pela orientação, incentivo, amizade, apoio e confiança na realização desse trabalho.

À professora Dra. Iara Alvarenga Mesquita Pereira e Dr. Luciano Paiva pelas sugestões e participação na banca examinadora.

Aos pesquisadores Dr. Osmar Alves Lameira e Heráclito Eugênio da Conceição, da EMBRAPA, pelo incentivo e amizade.

Ao amigo Edson Artiaga pela valiosa amizade e auxílio nos momentos de dificuldades no decorrer deste curso.

Aos companheiros do Laboratório de Cultura de Tecidos, Evaldo, Vantuil, Claret, Janaina, Juliana, Isabela, Ricardo, Valéria, Gabriela, Clara, Camila, Regina, Berildo, Marli, Fidelis e Vicentina, pela ajuda e agradável convívio.

Aos colegas de curso em especial as amigas Flávia Dionísio e Flávia Landa, pela força e agradável convívio.

Aos funcionários dos Departamentos de Agricultura e de Biologia e aos bibliotecários da UFLA, pela atenção dispensada.

Aos professores Manuel Losada Gavilanes, Evaristo Mauro de Castro pelo auxílio científico.

Aos estimados amigos Ana Cardoso, Fábio Coccoza, Márcia Yasue Kawamura, Pedro Henrique, Rozane Silva, Simonara Oliveira, Sara e Eduardo Figueiredo, pela amizade e expressivo apoio.

Às minhas irmãs em Cristo, Neuza, Cici, Elza, Ivani, Andréia, Léia, Zezé, Maria e Noemi, pelo reforço espiritual com suas orações.

Aos meus irmãos Sônia, Paulo, Levi, José Cláudio, Oséias e demais familiares pelo incentivo .

Enfim a todos que, sem saber, me proporcionaram alegria por um simples sorriso ou por pequenas frases que serviram como grande incentivo.

Ao único Deus, o nosso Senhor, sejam dados, por meio de Jesus Cristo, o nosso Senhor, a glória, a grandeza, o poder e a autoridade, desde todos os tempos, agora e para sempre! (Judas 25).

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1.....	1
1.1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
1.2.1 Caracterização botânica da espécie.....	4
1.2.2 Caracterização fitoquímica.....	6
1.2.3 Uso popular e atividade medicinal.....	7
1.2.4 Cultivo in vitro.....	8
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
CAPÍTULO 2: PROPAGAÇÃO IN VITRO DE <i>Tridax procumbens</i>	14
2.1 RESUMO	15
2.2 ABSTRACT	16
2.3 INTRODUÇÃO	17
2.4 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.4.1 Meios nutritivos e reguladores de crescimento.....	19
2.5 MATERIAL E MÉTODOS	22
2.5.1 Estabelecimento de <i>Tridax procumbens</i> em diferentes concentrações do meio MS.....	22
2.5.2 Indução de brotações em segmentos nodais de <i>Tridax procumbens</i>	23
Experimento I.....	23
Experimento II.....	24
2.5.3 Influência de dois intervalos de repicagem na produção de plântulas in vitro.....	24

2.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
2.6.1 Estabelecimento de <i>Tridax procumbens</i> através de segmentos nodais.....	25
2.6.2 Indução de brotações em segmentos nodais de <i>Tridax procumbens</i>	28
Experimento I.....	28
Experimento II.....	31
2.6.3 Influência de dois intervalos de repicagem na produção de plântulas in vitro	39
2.7 CONCLUSÕES.....	41
2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
CAPÍTULO 3: CALOGÊNESES E CRESCIMENTO CELULAR EM <i>Tridax procumbens</i>	47
3.1 RESUMO	48
3.2 ABSTRACT	49
3.3 INTRODUÇÃO	50
3.4 REFERÊNCIAL TEÓRICO	51
3.4.1 Calos e reguladores de crescimento.....	52
3.5 MATERIAL E MÉTODOS	55
3.5.1 Efeito de diferentes reguladores de crescimento e tipo de explantes na indução de calos de <i>Tridax procumbens</i>	55
3.5.2 Diferenças na indução de calos em fontes de explantes obtidas in vitro e in vivo.....	56
3.5.3 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de <i>Tridax procumbens</i>	57
3.5.4 Diferenças na estrutura celular de fontes de explantes cultivadas in vitro e in vivo.....	57
3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.6.1 Efeito de diferentes reguladores de crescimento e tipo de explantes na indução de calos de <i>Tridax procumbens</i>	59

3.6.2	Diferenças na indução de calos em fontes de explantes obtidas in vitro e in vivo	66
3.6.3	Estabelecimento da curva de crescimento de calos de <i>Tridax procumbens</i>	70
3.6.4	Diferenças na estrutura celular de fontes de explantes cultivadas in vitro e vivo.....	72
3.7	CONCLUSÕES.....	74
3.8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	ANEXOS	78

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D= 2,4-diclorofenoxiacético

2ip= N-Isopentenil aminopurina

AIB= Ácido indolbutírico

ANA= Ácido naftalenoacético

BA= Benziladenina

BAP= 6-Benzil aminopurina

mg/L= Miligrama por litro

MS= Murashige & Skoog (meio de cultura)

PF= Peso fresco

PS= Peso seco

TDZ= Tidiazuron

RESUMO

CERQUEIRA, E.S. Propagação e calogênese in vitro em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), uma planta medicinal. Lavras: UFLA, 1999. 81p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).

A espécie *Tridax procumbens* é originária da América Central e freqüente nas regiões sudeste e centro-oeste do Brasil. Conhecida como erva-de-touro ou margaridinha, possui propriedade antiinflamatória, cicatrizante, broncodilatadora, antidiarréica e inseticida. Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e de Biologia da Universidade Federal de Lavras, MG, Brasil, com o objetivo de equacionar condições adequadas para a micropropagação e a indução de calos. Os explantes oriundos do cultivo in vivo foram desinfestados em álcool 70% por trinta segundos e imersos em hipoclorito de sódio comercial a 30% com duas gotas de detergente neutro sob agitação por dez minutos que posteriormente foram lavados por cinco vezes em água destilada e autoclavada em câmara de fluxo laminar. Para efetuar o estabelecimento in vitro foram utilizados segmentos nodais do cultivo in vivo inoculados em diferentes concentrações do meio de cultura de Murashige e Skoog (MS) e em meio de cultura básico MS com suplemento de BAP e TDZ. Constatou-se que a concentração 50% dos sais do MS foi mais eficiente para o estabelecimento da espécie, produzindo melhor altura e peso da matéria fresca. Para indução de calos foram utilizados segmentos foliares e caulinares oriundos do cultivo in vitro e in vivo inoculados em meio MS sólido (0,6%), com pH 5,7 suplementados com diferentes concentrações de 2,4-D, AIB e ANA interagidos individualmente com 2,0mg/L de BAP, constatando-se segmento foliar como melhor tipo de explante para a indução de calos na presença de 2,0mg/L de ANA e 2,0mg/L de BAP, e maior ganho de matéria fresca com explantes provenientes do cultivo in vivo e acondicionados no escuro. Observaram-se diferenças entre estruturas anatômicas nos cortes efetuados nos tecidos dos explantes oriundos do cultivo in vitro e in vivo.

Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador) e Evaristo Mauro de Castro – UFLA.

ABSTRACT

CERQUEIRA, E.S. *In vitro* propagation and callogenesis in *Tridax procumbens* L., a medicinal plant. Lavras: UFLA, 1999. 81p. (Dissertation - Master's degree in Agronomy, area of Plant Physiology).

The species *Tridax Procumbens* is native to Central America and common to southeastern and central-western Brazil. Known as erva-de-touro or margaridinha (Herb of bull or little daisy), it possesses anti-inflammatory and healing, bronchodilating, anti-diarrheic and insecticide properties. The works were undertaken in Biotechnology and Biological Laboratory of the Universidade Federal de Lavras, MG, Brazil, with the view to put into equation the conditions suitable for micropropagation and induction of calluses. The explants coming from the *in vivo* cultivation were disinfected in 70% alcohol for 30 seconds and immersed into 30% commercial sodium hypochlorite with two drops of neutral detergent stirring for ten afterwards were washed for five times in distilled water and autoclaved in laminar flux chamber. To proceed the *in vitro* establishment, nodal segments of the *in vivo* cultivation inoculated at different concentrations of Murashige and Skoog (MS) culture medium and basic MS culture medium with a supplement of BAP and TDZ. It was found that the concentration 50% of the MS salts was the most efficient to the establishment of the species, yielding greater height and weight of the fresh matter. For callus induction were utilized leaf and stem segments from the *in vitro* and *in vivo* cultivation inoculated in solid MS medium (0.6%) with pH 5.7 supplemented with different concentrations of 2,4-D, AIB na ANA interacted singly with 2.0mg/L of BAP, leaf segment being considered the best sort of explant for inducing calluses in the presence of 2.0mg/L of ANA and 2.0mg/L BAP and higher fresh matter gain with explant coming from the *in vivo* cultivation and conditioned in the dark. Differences were observed among anatomical structures in the section performed in the tissues of the explants from the *in vitro* and *in vivo* cultivation.

Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Major Professor) and Evaristo Mauro de Castro - UFLA.

Capítulo 1

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas na prevenção e cura de moléstias, condicionadas a um processo de experimentação empírica, constitui a base da medicina popular e é praticada desde os primórdios da civilização humana. Entre as décadas de 1950 a 70, as plantas foram marginalizadas em virtude do grande impulso que a química orgânica proporcionou na medicina alopática. Entretanto, a partir da década de 80, a fitoterapia vem sendo retomada pela medicina natural que têm procurado aproveitar suas práticas, oferecendo-lhes respaldo científico e integrando-as num conjunto de princípios que tem como meta a cura de algumas doenças, além de restituir o homem à vida natural (Alzugaray e Alzugaray, 1996; Matos, 1987).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que cerca de 80% da população mundial fez uso de algum tipo de erva na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Desse total, pelo menos 30% foi por indicação médica (Martins et al., 1995).

Na verdade, enquanto as plantas se encontram ao alcance de todos, os medicamentos industrializados têm, como principal obstáculo o alto custo, tanto para o consumidor individual como para as entidades previdenciárias, fator agravado pela ocorrência de efeitos colaterais ocasionados pelo seu uso constante. (Alzugaray e Alzugaray, 1996).

Estima-se que das 500 mil espécies de plantas existentes no planeta, 16% encontram-se na Região Amazônica brasileira, dos quais menos de 10% foram estudados quimicamente e apenas um pequeno número teve suas propriedades biológicas caracterizadas (Pletsch, 1998). Entre as centenas de espécies medicinais, das quais a população faz uso, algumas contêm elevado potencial de

cura para diferentes tipos de doenças e várias já estão sendo extraídas em larga escala para suprir a demanda de laboratórios farmacêuticos internacionais (Gomes, 1998).

Nos últimos 25, anos em países industrializados, 25% das prescrições de drogas contém princípio ativo extraído de plantas superiores. Embora a química orgânica moderna tenha contribuído para um aumento de compostos sintéticos para uso na medicina, várias drogas importantes da medicina moderna são extraídas de plantas medicinais (Lameira, 1997).

De maneira geral, o que se observa é a tendência mundial de valorização dos produtos naturais de plantas, que reflete no aumento da demanda por estes produtos. Entretanto, nos últimos anos as dificuldades em assegurar um bom suprimento de plantas medicinais tem aumentado devido ao decréscimo drástico nas reservas naturais, pela exploração irracional, perturbação do ambiente natural pelo homem, encarecimento de mão-de-obra e dificuldades técnicas em cultivar plantas selvagens (Tabata, 1977).

A carência de informações científicas sobre plantas medicinais ou com potencial medicinal tem levado cientistas a direcionarem suas pesquisas, não somente aos níveis farmacológico e químico, como também ao da fisiologia do desenvolvimento, pois é de fundamental importância obter o conhecimento de técnicas adequadas de cultivo dessas espécies, para atender à demanda crescente (Clemente Filha, 1996).

Deste modo, a cultura de tecidos e células vegetais contribui como uma alternativa promissora para suprimento de material constante e homogêneo, independente de mudanças climáticas ou condições de solo. A tecnologia do cultivo *in vitro* pode ser aplicada em plantas medicinais através da micropropagação, cultura de calos e suspensão celular visando a produção de metabólitos secundários. A exploração da capacidade biossintética de várias culturas celulares por alguns grupos de cientistas tem ocorrido em vários países

nas últimas décadas, obtendo resultados satisfatórios. Entretanto, novos conhecimentos têm sido relatados para uma variedade de substâncias utilizáveis nas indústrias farmacêuticas, cosméticos e alimentos (Tabata, 1977).

Este trabalho teve como objetivo estudar uma metodologia de micropropagação, a indução de calos e curva de crescimento para *Tridax procumbens* L., considerada uma espécie medicinal.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Caracterização botânica da espécie

Tridax procumbens L., conhecida popularmente como Margaridinha (Brandão, Gavilanes e Laca-Buendia, 1985) e erva-de-touro (Lorenzi, 1991), é uma espécie que pertence à família das Asteraceas, tribo Heliantheae, subtribo Galinsoganae e ao gênero *Tridax* (Barcelar, 1994).

Trata-se de planta originária da América Central, se estendendo para América do Sul. No Brasil é bastante freqüente nas regiões sudeste e centro-oeste, sendo encontrada em Minas Gerais, no sul, triângulo e norte do estado (Kissmann e Groth, 1992; Barcelar, 1994).

Trata-se de uma planta herbácea, anual ou bianual, que se reproduz por sementes, possui muitos caules decumbentes ou ascendentes, com até 40 cm de comprimento. Seu caule é, em grande parte, prostrado, ramificado e com formação de algumas raízes adventícias a partir dos nós em contato com solo. Possui raiz principal pivotante, folhas simples, curto-pecioladas, opostas; limbo ovalado, de base curtamente atenuada e ápice agudo, com margens irregularmente denteadas; coloração verde ou verde-acinzentada; curtos pêlos superficiais; inflorescência com capítulos isolados, no ápice de hastes de até 30cm de comprimento, de superfície curto-pilosa, na parte terminal dos ramos; flores centrais, hermafroditas, de corola amarelo-ouro; aquênios subcilíndricos, com menos de 1mm de comprimento, de superfície escura, intensamente recoberta de pêlos brancos (Kissmann e Groth, 1992) (Figura 1).



FIGURA 1. Fotografia ilustrativa da descrição botânica da planta erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.). UFLA, Lavras, MG, 1999.

A classificação da espécie em estudo foi efetuada pelo professor Manuel Losada Gavilanes, cuja exsicata tem registro n°. 14897 no herbário da ESAL-UFLA, Lavras, MG, Brasil.

1.2.2 Caracterização fitoquímica

As plantas sintetizam compostos químicos a partir dos nutrientes, da água e da luz que recebem. Muitos desses compostos ou grupos deles podem provocar reações nos organismos: são os princípios ativos. A planta considerada medicinal é aquela que contém um ou mais de um princípio ativo, conferindo-lhe atividade terapêutica, porém, quando administrados em doses elevadas podem causar toxicidade (Martins et al., 1995). Um grande número de compostos orgânicos naturais de origem vegetal, produtos do metabolismo primário e secundário, é usado para as mais diversas finalidades, tanto na terapêutica médica para a prevenção e cura de doenças, como na indústria de cosméticos e de alimentos, servindo como aromatizantes, flavorizantes ou antioxidantes. (Plestsch, 1998).

Os princípios ativos produzidos pelas plantas medicinais são, com poucas exceções, compostos sintetizados a partir do metabolismo secundário. Essa via metabólica caracteriza-se por produzir metabólitos que participam ativamente nos processos de crescimento e desenvolvimento (Taiz e Zeiger, 1991). Swain (1977) inclui também, entre esses compostos, as proteínas e polissacarídeos ácidos (mucilagens), produtos do metabolismo primário.

O teor dessas substâncias, acumuladas em diferentes partes dos vegetais, varia substancialmente, considerando-se as diferentes fases de desenvolvimento das plantas e de acordo com os fatores ambientais a que estão submetidas (Clemente Filha, 1996).

Para análise fitoquímica, vários compostos foram isolados dos extratos de *Tridax procumbens* através de sistema cromatográfico, onde foram descritas a ocorrência de taninos, ácido fumárico, β -sitosterol, alcoois alifáticos, ésteres de ácidos graxos e óleos essenciais na planta, luteonina, glucoluteolina, quercetina, isoquercetina nas flores (Verma e Gupta, 1988; Pathax e Dixit, 1988).

1.2.3 Uso popular e atividade medicinal

Tridax procumbens L. é uma planta com propriedades medicinais, utilizada popularmente em alguns países do mundo como Nepal, Índia e Guatemala (Taylor et al., 1996; Villar et al., 1997; Pathak, Saraf e Dixit, 1991). É utilizada em forma de cataplasma e suco da planta toda (Kakrani e Saluja, 1994; Manandhar, 1989; Taylor et al., 1996).

Verma e Gupta, (1988) descrevem o seu uso no tratamento de catarro brônquico, disenteria e diarreia, além das propriedades antissépticas, inseticida, anti-hemorragica e cicatrizante. Sua ação como cicatrizante também foi citada por Udupa, Udupa e Kulkarni (1991); Udupa, Kulkarni e Udupa (1995) e Villar et al. (1997). A ação inseticida e repelente de insetos desta planta foi citada por Pathak e Dixit (1988), tendo Saraf, Pathak e Dixit (1991) caracterizando-a como promotora de crescimento de pêlos em ratos.

A espécie foi ainda descrita como possuindo função hepatoprotetora e, em estudo de levantamento etnobotânico, foi mencionada como antiinflamatória (Pathak, Saraf e Dixit, 1991; Saraf et al., 1992; Kakrani e Saluja, 1994). Seu efeito antiviral e antibiótico foi demonstrado contra espécies de vírus causadores da tosse, febre e resfriado (Taylor et al., 1996).

Villar et al. (1997) relataram que a espécie possui atividades antiparasitárias (ameba e malária); antiinflamatória (gastrite e artrite reumatóide), metabólicas (diabete e diurética) atuando também nas desordens sangüneas e vasculares (anemia, coagulação e hipertensão).

Extratos da planta inteira são medicinalmente superiores a aquelas extrações purificadas ou isoladas, conforme evidenciado por Udupa, Kulkarni e Udupa (1995), quando estudaram a cicatrização de feridas em ratos albinos.

Não foram encontrados relatos acerca de seu uso no Brasil, o que explica, talvez pelo desconhecimento de suas atividades medicinais.

1.2.4 Cultivo in vitro

O desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos vegetais tem aberto grandes perspectivas em muitas áreas relacionadas a produção vegetal, entre elas: a micropropagação de muitas espécies, cultivo de plantas livres de doenças, estudo do metabolismo primário e secundário, e melhoramento de plantas (Grattapaglia e Machado, 1990). Através da cultura de tecidos, praticamente qualquer espécie vegetal pode ser regenerada, utilizando-se vários processos (Dixon, 1985). As plantas podem ser regeneradas através de embriões, ápices caulinares, gemas axilares ou tecidos não meristemáticos através de organogênese ou embriogênese.

A cultura de tecidos vegetais é de grande interesse, tendo em vista que diversas espécies encontram-se em vias de extinção em função de vários fatores como a intervenção do homem em seu meio, a ação da poluição desfavorecendo a coleta de plantas saudáveis. Com essa tecnologia, é possível conservá-las in vitro em meios de manutenção e programar a produção comercial, visando a produção de princípios ativos.

Várias espécies de plantas medicinais têm sido submetidas a experimentos de micropropagação (Bhojwani, 1980; Lameira, Costa e Pinto, 1994; Costa, 1995; Kajiki, 1996; Becker, 1997; Abreu, 1997; Lameira, 1997; Fidélis, 1998; Coelho, 1999; Pereira, 1999).

A erva-de-touro produz sementes quase o ano todo, as quais têm dormência inicial e germinação escalonada. Apesar de ser uma espécie que propaga-se com facilidade, a micropropagação oferece vantagens para prática agrícola como a rapidez na obtenção de um grande número de mudas que pode ser explorada economicamente devido a produção de seus princípios ativos úteis e na conservação de espécies ameaçadas (Pletsch, 1998).

Devido ao grande potencial farmacológico e médico, aliado à inexistência de trabalhos voltados para biotecnologia, toma-se necessário

estabelecer o protocolo de micropropagação dessa espécie bem como a indução de calos e estabelecimento da curva de crescimento para possibilitar a maximização da produção de seus princípios ativos.

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, I.N. de Propagação “in vivo” e “in vitro”, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides*. Lavras: UFLA, 1998. 113p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia vegetal).
- ALZUGARAY, D. ALZUGARAY, C. Plantas que curam. São Paulo: Três, v.1, 1996, 260p.
- BARCELAR, M. *Tridax procumbens* L.–Asteraceae. Planta daninha de citação recente para o estado de Minas Gerais. *Daphne*, Belo Horizonte, v.4, n.2, p.58-61, abril, 1994.
- BECKER, L. Propagação vegetativa *in vivo e in vitro*, indução de calos, nutrição, extração e quantificação de alcalóides nas espécies *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. (Quebra-pedras). Lavras: UFLA, 1997. 96p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- BHOJWANI, S.S. In vitro propagation of garlic by shoot proliferation. *Science Horticulturæ*, Amsterdam, v.13, p.47-52, 1980.
- BRANDÃO, M.; GAVILANES, M.L.; LACA-BUENDIA, J.P. Plantas daninhas raramente mencionadas ou não citadas como ocorrentes em Minas Gerais. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 11, n.129, p.12-15, set. 1985.
- CLEMENTE FILHA, A.C. Aspectos fisiológicos e fitoquímicos de *Bauhinia forficata* Link e *Plantago major* L. Lavras: UFLA, 1996. 67p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- COELHO, M.C.F. Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]. Lavras: UFLA, 1999. 119p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- COSTA, M.P. Desenvolvimento e teor de alcalóides em plantas de Ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*, A. Richard) obtidas *in vitro* submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação. Lavras: UFLA, 1995. 61p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- DIXON, R.A. (ed.) *Plant cell culture, a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1985. p.79-105.

- FIDÉLIS, I. Micropropagação de mama-cadela (*Brosimum guadichaudii* Tréc.): uma espécie considerada medicinal. Lavras: UFLA, 1998. 109p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- GOMES, L.J. Extrativismo e comercialização da fava-d'anta (*Dimorphandra* sp.): estudo de caso na região de cerrado de Minas Gerais. Lavras: UFLA, 1998. 158p. (Dissertação - Mestrado em Engenharia Florestal).
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.) Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-170.
- KAJIKI, F.O. Estudo das condições para indução de calos e produção de compostos secundários em *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. Piracicaba: ESALQ, 1996. 96p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas).
- KAKRANI, H.K.N.; SALUJA, A.K. Traditional treatment through herbs in Kutch district, Gujarat State, India. Part II. Analgesic, anti-inflammatory, antirheumatic, antiarthritic plants. *Fitoterapia*, Roma, v. 65, n. 5, p.427-430, 1994.
- KISSMANN, K. G.; GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas. São Paulo: BASF Brasileira, 1992. tomo 2, *Tridax procumbens* L. p.363-365.
- LAMEIRA, O.A. Propagação in vitro e in vivo, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.) Lavras: UFLA, 1997. 87p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia)
- LAMEIRA, O.A.; COSTA, M.P.; PINTO, J.E.P.B. The efficiency of shoot and plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* after three subcultures "in vitro". *Ciência Rural*, Santa Maria, v.24, n.3, p.523-526, set/dez.1994.
- LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 1991. 440p. *Tridax procumbens* L., p.108.
- MANANDHAR, N.P. Medicinal plants used by Chepang tribes of Makawanpur district, Nepal. *Fitoterapia*, Roma, v.60, n.1, p.61-68, 1989.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, E.R.; CASTELLANI, D.C. et al. Plantas Medicinais. Viçosa: UFV, 1995. 220p.

- MATOS, F.J.A. **O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha.** Mossoró: ESAM, 1987. v.18, 220p.
- PATHAK, A.K.; DIXIT, V.K. Insecticidal and insect repellent activity of essential oils of *Tridax procumbens* and *Cyathocline lyrata*. **Fitoterapia**, Roma, v. 59, n.3, p.211-214, 1988.
- PATHAK, A.K.; SARAF, S.; DIXIT, V.K. Hepatoprotective activity of *Tridax procumbens*. Part. I. **Fitoterapia**, Roma, v.62, n.4, p.307-313, 1991.
- PEREIRA, F.D. **Propagação *in vitro* e identificação de metabólitos secundários em plantas de chapéu de couro (*Echinodorus cf scaber*), uma planta medicinal.** Lavras: UFLA, 1999. 112p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotechnology, Ciência & Desenvolvimento**, Uberlandia, n.4, p.12-15, Jan/Fev, 1998.
- SARAF, S.; DIXIT, V.K.; TRIPATHI, S.C.et al. Hepatoprotective actidy of *Tridax procumbens*. Part III. **Fitoterapia**, Roma, v.63, n.5, p.414-416, 1992.
- SARAF, S.; PATHAK, A.K.; DIXIT, V.K. Hair growth promoting activity of *Tridax procumbens*. **Fitoterapia**, Roma, v.62, n.6, p. 495-498, 1991.
- SWAIN, T. Secondary compounds a protective agents. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.2, p.479-501, 1977.
- TABATA, M. Recent advances in the production medicinal substances by plant cell culture. In: BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENK, M.H.; l.ed. **Proceedings in life science-plant tissue cultures and its biotechnology applications.** Berlin: Springer Verlag, 1977. p.3-16.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology.** New York: The Benjamim Cummings Publishing Company INC., 1991. 559p.
- TAYLOR, R.S.L.; HUDSON, J.B.; MANANDHAR, N.P.et al. Antiviral activities of medicinal plants of southern Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausane, n.53, p.97-104, 1996.
- UDUPA, A.L; KULKARNI, D.R.; UDUPA, S.L. Effect of *Tridax procumbens* extracts on wound healing. **International Journal of Pharmacognosy**, Netherlands, v.33, n.1, p.37-40, 1995.

- UDUPA, S.L.; UDUPA, A.L.; KULKARNI, D.R. Influence of *Tridax procumbens* on dead space wound healing. *Fitoterapia*, Roma, v.62, n.2, p.146-150, 1991.
- UDUPA, S.L.; UDUPA, A.L.; KULKARNI, D.R. Influence of *Tridax procumbens* on lysil oxidase activity and wound healing. *Planta Médica*, Poland, v.57, p.325-327, 1991.
- VERMA, R.K.; GUPTA, M.M. Lipid constituents of *Tridax procumbens*. *Phytochemistry*, Oxford, v.27, n.2, p.459-463, Feb. 1988.
- VILLAR, R.; CALLEJA, J.M.; MORALES, C. et al. Screening of 17 Guatemalan medicinal plants for platelet antiaggregant activity. *Phytotherapy Research*, New York, v. 11, p.441-445, 1997.

Capítulo 2

PROPAGAÇÃO “IN VITRO” DE *Tridax procumbens* L.

RESUMO

CERQUEIRA, E.S. Propagação in vitro de *Tridax procumbens* L. Lavras: UFLA, 1999. 81p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).

Tridax procumbens L. é uma espécie com propriedades medicinais conhecida popularmente como margaridinha ou erva-de-touro. Devido a ação de seus princípios ativos, é indicada como broncodilatadora, antidiarréica, cicatrizante e antiinflamatória. Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, onde, para efetuar o estabelecimento in vitro da erva-de-touro, foram utilizados como fonte de explantes segmentos nodais caulinares. Avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de sais do meio MS (Murashige e Skoog, 1962), diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) e TDZ (tidiazuron) e influência do intervalo de repicagem com o objetivo de estabelecer um protocolo de multiplicação in vitro da espécie. A concentração do meio MS 50% produziu maior altura das plântulas e ganho da matéria fresca da parte aérea. Na utilização de citocininas, o BAP em menores concentrações mostrou-se mais eficiente que TDZ, produzindo maior altura das plântulas, número de brotos e raízes e também peso da matéria fresca e seca da parte aérea. Maior número de plântulas pode ser obtido no período de 20 dias de repicagem.

Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador) e Evaristo Mauro de Castro – UFLA.

ABSTRACT

CERQUEIRA, E.S. *In vitro* propagation of *Tridax procumbens* L. Lavras: UFLA, 1999. 81p. (Dissertation - Master in Plant Physiology).

Tridax procumbens L. is a species with medicinal properties know popularly as margaridinha or erva-de-touro (little daisy or herb- of- bull). Due to action of its active principles, it is prescribed as bronchodilator, antidiarrheic, healing and anti-inflammatory. The works were undertaken in Biotechnology Laboratory of the Department of Agriculture of the Universidade Federal de Lavras, where, to proceed *in vitro* establishment of erva-de-touro, were utilized as a source of explants stem nodal segments. The effect of different concentrations of salts in the MS medium (Murashige and Skoog, 1962), different concentrations of BAP (6- benzilaminopurina) and TDZ (Thidiazuron) and influence of the transplanting interval with the objective of establishing an *in vitro* multiplication protocol of species were evaluated. The concentration of the 50% MS medium produced greater height of seedlings and gain of the aerial part dry matter. In the use of cytokinines, BAP at lower concentrations proved more efficient than TDZ, yielding greater height of the seedlings, number of sprouts and also weight of the fresh and dry matter of the aerial part. Greater number of seedlings may be obtained over the period of 20 days transplanting.

Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Major Professor) and Evaristo Mauro de Castro - UFLA.

2.3 INTRODUÇÃO

A micropropagação é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e a de mais larga utilização, da qual além de outras vantagens, pode-se obter um grande número de plantas saudias e geneticamente uniformes, acelerando os métodos de propagação convencional o que a torna bastante viável economicamente.

O controle do crescimento e da morfogênese a partir de explantes *in vitro* é uma das características da cultura de tecidos vegetais. Estes fenômenos ocorrem cultivando-se os explantes em um meio nutritivo, por isso, é fundamental o conhecimento dos componentes e propriedades dos meios de cultura.

O meio de cultura deve suprir tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com macro e micronutrientes e também um carboidrato que fornece energia metabólica e esqueletos de carbono para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais e todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento das células. Geralmente se utiliza sacarose, pois esse açúcar suporta altas taxas de crescimento das espécies.

Normalmente incluem-se ao meio de cultura certos componentes orgânicos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento. Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que, uma vez aplicadas a plantas inteiras ou a segmentos de tecidos vegetais, provocam atividades fisiológicas similares aos hormônios que todas plantas possuem naturalmente e que têm a função de regular os processos metabólicos que envolvem crescimento e desenvolvimento.

O objetivo do trabalho foi o de determinar uma metodologia que permita a propagação *in vitro* da espécie *Tridax procumbens* em grande escala.

2.4 REFERENCIAL TEÓRICO

A biotecnologia oferece três estratégias para a produção de compostos bioativos:

1)-os processos fermentativos, nos quais o crescimento da biomassa e a biossíntese do produto ocorrem em biorreatores;

2) a engenharia genética, que objetiva a alteração do genoma das células através da introdução de novos genes das quais, conseqüentemente, obtêm-se células, órgãos e plantas transgênicas com características bioquímicas alteradas ;

3) a micropropagação, através da qual clones selecionados pelas suas características fenotípicas e livres de patógenos são propagados em condições assépticas e rigorosamente controladas (Pletsch, 1998).

Várias espécies de plantas medicinais têm sido utilizadas para a multiplicação de brotos e a regeneração de calos (Singh et al., 1992; Malarz et al., 1993; Chen, Hua e Yin, 1993; Paniego e Giulietti, 1994; Nin et al., 1994; Duskova e. Dusek, 1995; Hasegawa, Yabe e Morita, 1995; Keriko et al., 1995). Espécies herbáceas são mais fáceis de clonar in vitro do que outras espécies, como no caso das espécies lenhosas.(Pierik, 1987), sendo que entre os métodos disponíveis, estão a multiplicação de brotos a partir de gemas axilares e a formação de brotos adventícios ou embriões somáticos adventícios (George, 1993).

Para se obter sucesso no estabelecimento in vitro de plantas, alguns fatores devem ser observados, como as condições em que as plantas matrizes são mantidas em casa de vegetação, posição do explante na planta, época do ano, nível endógeno de hormônio, tamanho do explante, método de inoculação, fatores físicos de crescimento e adição de outras substâncias no meio de cultura (por exemplo, reguladores de crescimento).

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a propagação *in vitro* de *Tridax procumbens* L.

2.4.1 Meios nutritivos e reguladores de crescimento

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*.

Várias formulações de meio têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. A diferença básica entre elas está na concentração dos sais utilizados. O meio MS, assim denominado por ter sido estabelecido por Murashige e Skoog (1962), é seguramente o mais amplamente utilizado, seguido pelo meio de Gamborg, B₅, (1968) (Caldas, Haridasan e Ferreira 1998). Ele é muito rico em sais e é freqüentemente utilizado na fase de multiplicação, mas pode causar toxidez e outros problemas fisiológicos em algumas espécies, segundo Sato (1994).

Testes detalhados são necessários para estabelecer as combinações e concentrações de reguladores de crescimento eficazes para induzir a resposta desejada em cada tipo de explante e espécie (Pasqual e Barros, 1992; Arello e Pinto, 1993; Pinto et al., 1994; Caldas, Haridasan e Ferreira 1998).

A adição de fitoreguladores tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz, estimulando respostas como crescimento e alongamento ou multiplicação da parte aérea. Estas respostas dependem do estado fisiológico dos explantes, o que está relacionado com a época do ano em que são cultivados e estado geral da planta matriz (Grattapaglia e Machado, 1990).

As citocininas constituem o grupo de fitoreguladores indispensáveis para a quebra de dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares. Em

geral, uma relação alta entre citocininas e auxinas propiciam a formação de brotos (Grattapaglia e Machado, 1990).

A benzilaminopurina (BAP) tem sido muito eficaz para promover multiplicação em diversas espécies e é citada como sendo a citocinina por excelência na multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias. Torres e Caldas (1990) afirmam que o BAP é a citocinina mais potente para promover a proliferação de partes aéreas e economicamente melhor por ser a mais barata. Entretanto, a maior eficiência está na capacidade dos tecidos vegetais em metabolizar os hormônios naturais mais rapidamente do que reguladores de crescimento artificiais. Porém, essa não é uma regra absoluta e, conforme a espécie, outras citocininas podem apresentar melhores resultados.

Com grande eficiência para a indução de brotações., o tidiazuron (TDZ) também tem sido relacionado entre as novas citocininas.

O TDZ é um regulador de crescimento derivado da uréia, descoberto pela Shering AG (Berlin, Germany) em 1976 para ser utilizado no desfolhamento da cultura do algodão (Mok et al., 1987; Fellman, Read e Hosier, 1987; Lu, 1993). Sua composição química é N-phenil-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea, com estrutura sem anel purínico, ao contrário do que acontece com as citocininas. Este produto foi citado como tendo ação citocinínica, principalmente quando aplicado em concentrações muito reduzidas, em torno de 0,0022 a 0,088mg/L, e por isto tem sido cada vez mais utilizado na cultura de tecidos (Lu, 1993; Luz et al., 1998).

O mecanismo pelo qual o TDZ induz respostas semelhantes aos das citocininas não é completamente entendido. Uma hipótese é que o TDZ promova a conversão das citocininas ribonucleotídeas em ribonucleosídeas, as quais são biologicamente mais ativas (Lu, 1993). Para Mok et al. (1987), as várias citocininas do grupo das feniluréias, inclusive o TDZ, devem possuir a capacidade de modificar o metabolismo natural de ocorrência das citocininas,



proporcionando autonomia dos tecidos vegetais em relação à sua produção. Os resultados obtidos em calos de soja (*Glycine max* - Leguminosae) por Thomas e Katterman (1986), sob dois níveis de TDZ, dão suporte a esta última hipótese de que o Tiazuron induz a biossíntese de citocinina endógena.

Várias espécies de plantas medicinais têm sido submetidas a experimentos de micropropagação utilizando reguladores de crescimento, como em *Eclipta alba* Hassk (Asteraceae), estudada por França, Bertoni e Pereira (1995), os quais reportam que grande número de brotos foi obtido após 60 dias de cultivo em meio MS suplementado com 4,4 μ M de BAP. Já Nin et al. (1994) obtiveram uma alta taxa de proliferação de brotos em *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) em meio MS suplementado com 1,78 μ M de BAP e 0,27 μ M ANA, mas os brotos apresentaram, geralmente, vitrificação que diminuiu quando o nível de BAP foi reduzido para 0,88 μ M e o ágar aumentado de 0,7 para 0,8%.

Folhas de *Coreopsis lanceolata* L. (Asteraceae) também cultivadas em meio MS com a combinação de ANA 0,5 a 2,0 e 5 a 40 μ M de BAP alcançou uma resposta de 1,4 até 4,3 brotos adventícios em qualquer das quatro concentrações de BAP em sete semanas após o cultivo (Lee et al., 1994).

Le (1994), cultivando dois clones de *Arnica montana* L. (Asteraceae) através de segmentos nodais em meio MS suplementado com combinação de cinetina, BAP, ANA, zeatina e 2-iP (isopenteniladenina), obteve a melhor média de proliferação de brotos (16 brotos por explante) com 4,44 μ M de BAP e 0,53 μ M de ANA.

Segmentos nodais de *Yucca aloifolia* L. (Liliaceae) cultivados in vitro em meio MS (1/2) suplementado com 1mg/L de TDZ em combinação com 0,2mg/L de ANA obtiveram alta taxa de proliferação de brotos (6,6) (Atta e Van, 1997). Já em *Brosimum guadichaudii* Tréc. (Moraceae), os segmentos nodais cultivados em meio MS suplementado com 3mg/L de TDZ tiveram somente 1,8 broto por explante (Fidélis, 1998).



2.5 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, estado de Minas Gerais, Brasil

2.5.1 Estabelecimento de *Tridax procumbens* L. em diferentes concentrações do meio MS.

Como fonte de explante foram usadas plantas cultivadas em casa de vegetação. Os segmentos nodais foram retirados de plantas com aproximadamente 45 dias de idade, as quais continham duas gemas que foram desinfestadas da seguinte forma: lavados em água corrente por trinta minutos, em seguida imersos em álcool 70% por trinta segundos e, então, transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio comercial a 30% com três gotas de detergente comercial neutro, mantendo-se sob agitação por 10 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar os segmentos nodais foram lavados quatro vezes em água destilada e autoclavada e, com o auxílio de pinça e bisturi, foram excisados aproximadamente a 0,8cm de comprimento e inoculados em meio básico de MS (Murashige e Skoog, 1962) solidificado com 0,6% de ágar nas seguintes concentrações dos sais: 12,5; 25; 50; e 100%.

O pH dos meios foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem que se deu a 121°C por 15 minutos; os explantes foram inoculados em tubos de vidro (25 x 150mm) contendo 15mL de meio; os tubos foram vedados com tampas plásticas e suas bordas protegidas com parafilme. Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ na presença de luz com fotoperíodo de 16 horas de luz sob $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância.

O delineamento estatístico utilizado foi o Inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições, sendo cada parcela composta por 4 tubos. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias analisadas por regressão polinomial após 40 dias do cultivo inicial, sendo as seguintes variáveis avaliadas: altura da plântula, número de brotos e raízes, peso da matéria fresca e seca da parte aérea e das raízes.

2.5.2 Indução de brotações em segmentos nodais de *Tridax procumbens* L.

Experimento I

Foram utilizadas como fonte de explantes, plântulas cultivadas in vitro em sala de crescimento. Segmentos nodais com aproximadamente com 0,8cm de comprimento foram excisados e inoculados em meio de cultura básico MS (Murashige e Skoog, 1962) com 0,6% de ágar suplementado com BAP (0; 0,5 e 1,0mg/L). O pH dos meios foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes de eles serem autoclavados a 121°C por 15 minutos. Os tubos receberam 15mL de meio, foram vedados com tampa plásticas e suas bordas protegidas com parafilme.

Os explantes foram incubados em salas de crescimento com temperatura controlada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ na presença de luz com fotoperíodo de 16 horas-luz sob $25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de irradiância.

Aos 30 dias, foram avaliados altura das plântulas, número de brotações e raízes, peso da matéria fresca e seca da parte aérea e das raízes. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições, sendo cada parcela composta por 4 tubos. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância utilizando o nível de significância de 1% para o teste F e as médias analisadas por regressão polinomial.

Experimento II

Na metodologia do experimento II modificaram-se somente as dosagens do regulador de crescimento, sendo utilizadas concentrações individuais (0; 0,125; 0,25; 0,5; e 1,0mg/L) de BAP e TDZ.

Aos 30 dias após do cultivo inicial, foram avaliados: altura da plântula, número de brotos e raízes, peso da matéria fresca e seca da parte aérea. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições, sendo cada parcela composta por 4 tubos. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância utilizando o nível de significância de 1% para o teste F e as médias analisadas por regressão polinomial.

2.5.3 Influência de intervalos de repicagem na produção de plântulas in vitro.

Como fonte de explante utilizaram-se plantas cultivadas em casa de vegetação, cujos segmentos nodais foram desinfestados da seguinte forma: lavados em água corrente por trinta minutos, em seguida imersos em álcool 70% por trinta segundos e, então, transferidos para solução de hipoclorito de sódio comercial a 30% com três gotas de detergente comercial neutro sob agitação por 10 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar foram lavados quatro vezes em água destilada e autoclavada e, com auxílio de pinça e bisturi, foram excisados com 0,8cm de comprimento e inoculados em meio básico de MS com 0,6% de ágar e 3% de sacarose, totalizando 100 tubos. Desse número foram retiradas amostras de 10 tubos, usadas para cada repicagem realizadas aos 20, 30, 40 e 60 dias,. Das quais obtiveram-se os resultados do número de segmentos nodais a partir de análises das médias.

2.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.6.1 Estabelecimento de *Tridax procumbens* L. através de segmentos nodais

As plântulas estabelecidas *in vitro*, a partir de segmentos nodais cultivados em diferentes concentrações dos sais do meio MS (12,5; 25; 50; e 100%), não apresentaram problemas de contaminação e crescimento.

O tratamento que proporcionou maior altura da brotação dos segmentos nodais foi o que continha 50% da concentração dos sais do meio MS. Obteve-se, neste tratamento, uma altura média de 11,9cm, enquanto que, para o tratamento com a concentração de 12,5% dos sais do meio MS, a altura da brotação dos segmentos nodais alcançou a média 3,3cm, o que diferiu estatisticamente mostrando com isso, que *Tridax* não é uma espécie exigente em sais, sendo sensível a altas concentrações dos sais presentes no meio MS.

As médias das alturas dos segmentos nodais não diferiram estatisticamente nas demais concentrações, com resultados de 6,4 e 9,6cm, respectivamente, para os tratamentos com 100 e 25% da concentração dos sais do meio MS. A Figura 2 mostra o efeito das concentrações dos sais do meio MS na altura das brotações de segmentos nodais de *Tridax procumbens*.

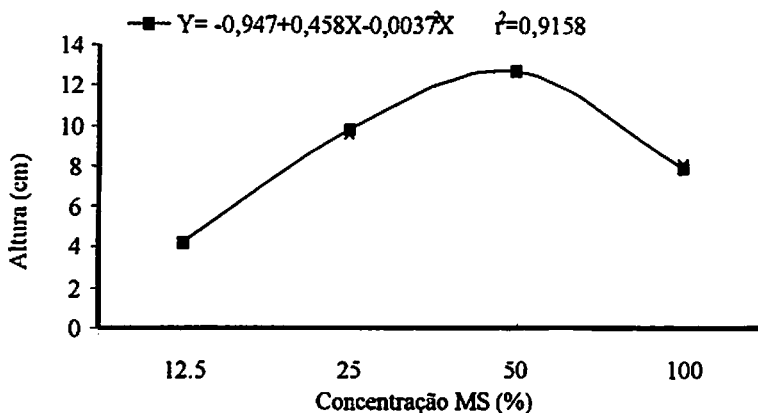


FIGURA 2. Efeito do meio de cultura MS sólido em diferentes concentrações de sais na altura (cm) da brotação dos segmentos nodais micropropagados de *Tridax procumbens* após 40 dias do cultivo inicial. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Resultado semelhante foi obtido por Farias et al. (1996) que, trabalhando com segmentos nodais amica silvestre (*Solidago microglosa* L. – Asteraceae) subcultivados em meio MS (25, 50 e 100%) da concentrações dos sais, observaram que o tratamento contendo 50% da concentração do meio MS foi o mais eficiente, produzindo, em média plântulas com 10mm de altura, 11,7 gemas e 5,2 raízes por planta.

Para a variável peso da matéria fresca da parte aérea, o melhor resultado foi com 50% da concentração dos sais do meio MS, obtendo 0,47g, seguindo as concentrações 25 e 100% do meio MS, as quais alcançaram 0,44 e 0,42g, respectivamente. O menor valor foi de 0,2g no tratamento com 12,5% da concentração do meio MS (Figura 3).

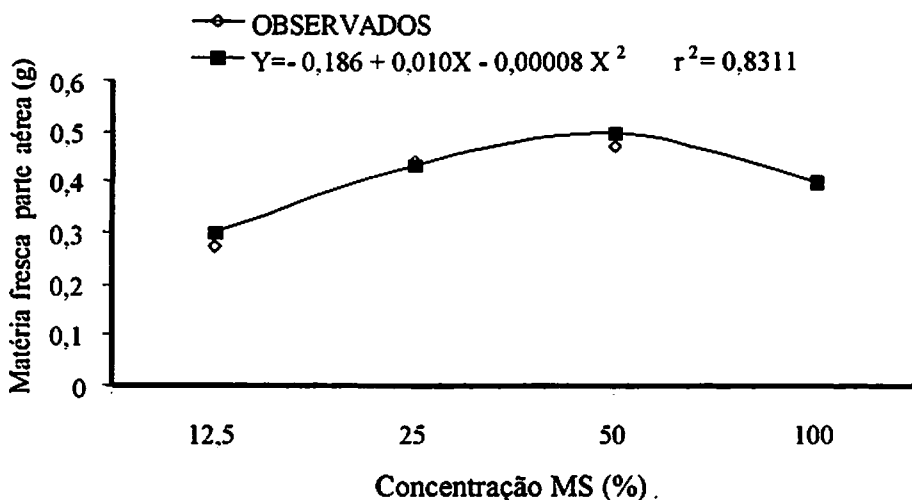


FIGURA 3. Efeito do meio de cultura MS sólido em diferentes concentrações de sais na matéria fresca da parte aérea (g) das brotações dos segmentos nodais micropropagados de *Tridax procumbens* após 40 dias do cultivo inicial. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Não ocorreu diferença significativa para as variáveis número de raízes, brotações e pesos das matérias fresca e seca das raízes e peso da matéria seca da parte aérea. Quanto ao número de raízes, estas desenvolveram-se igualmente em todos os tratamentos. Para o número de brotações, a média conseguida nos tratamentos foi 1,75 para 100, 50 e 12,5% das concentrações dos sais do meio MS e 2,0 para 25%.

Mesmo com uma pequena variação, o melhor resultado para o número de raízes e, conseqüentemente, maior ganho em matéria fresca e seca (Tabela 1) foi alcançado com a menor concentração dos sais do meio MS, confirmando que baixas concentrações de sais induzem ao enraizamento. Resultado diferente foi constatado em *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae), em que 100% da concentração do meio MS mostrou ser um dos melhores meio de cultura para a indução de brotações para esta espécie (Silva, Moreno e Viana, 1996).

Concentração dos sais MS(%)	Matéria fresca (g)		Matéria seca (g)	
	parte aérea	Raiz	parte aérea	Raiz
12,5	0,272	0,283	0,026	0,041
25	0,439	0,058	0,036	0,042
50	0,469	0,068	0,041	0,005
100	0,423	0,047	0,033	0,003

TABELA 1. Médias para matéria fresca e seca da parte aérea e raízes (g) em plântulas, a partir de segmentos nodais submetidos às diferentes concentrações do meio MS. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Em observações visuais, constatou-se que as folhas próximas à base dos explantes apresentaram sinais de amarelecimento no tratamento com a concentração de 100% dos sais do meio MS, sugerindo que a espécie foi sensível às altas concentrações que o meio MS possui.

2.6.2 Indução de brotações em segmentos nodais de *Tridax procumbens* L.

Experimento I

Foi constatada diferença significativa somente para altura das plântulas e o melhor resultado foi obtido com o meio MS ausente de regulador de crescimento, cuja média alcançada foi de 5,7cm. À medida em que acrescentou-se o BAP no meio de cultura, houve uma redução na altura das plântulas para 2,0cm, o que vem confirmar que a presença deste regulador no meio de cultura diminui o tamanho das plântulas (Figura 4).

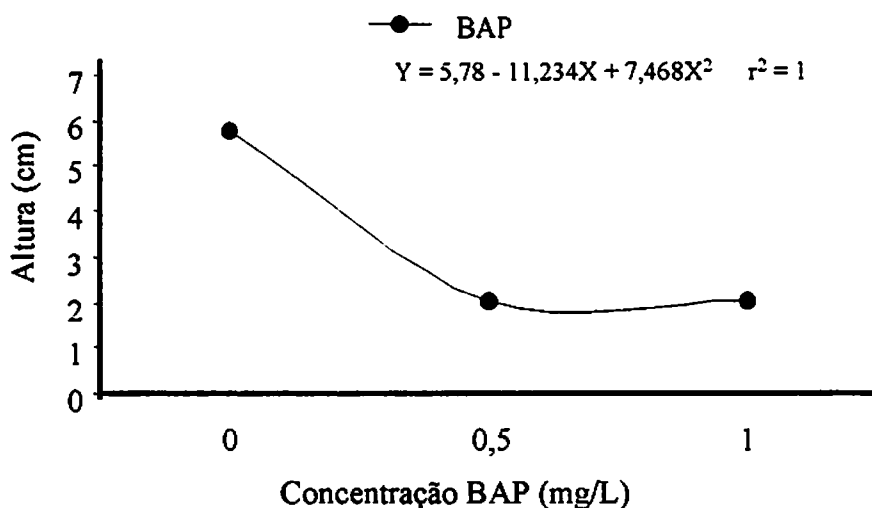


FIGURA 4. Efeito do meio MS suplementado com BAP (0; 0,5 e 1,0 mg/L) na altura (cm) de plântulas provenientes de segmentos nodais de *Tridax procumbens* aos 30 dias de cultivo in vitro. UFLA, Lavras, MG, 1999.

A mesma resposta foi encontrada em estudo feito com *Ipomoea batatas* L. (Convolvulaceae) por Alves (1988), no qual o meio MS ausente de regulador de crescimento foi o mais eficiente no seu crescimento e desenvolvimento. Em chapéu de couro (*Echinodorus cf scaber* Rataj - Alismataceae), a maior altura dos explantes também foi obtida em meio MS ausente de regulador de crescimento, cujo maior tamanho foi de 3,5cm e o menor de 1,0cm (Pereira, 1999). O desenvolvimento de plântulas de *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) propagadas em meio MS ausente de regulador foi considerado o mais eficiente, segundo estudos realizados por Saleh e Shepherd (1997).

Quanto ao número de brotações, elas mantiveram uma média de duas por segmento. Com relação às raízes, foi observado que, à medida em que acrescentou-se o BAP, o seu número tendeu a diminuir e as médias dos tratamentos variavam entre 4,0 a 2,5 (Quadro 2, anexos).

Nos demais tratamentos, foi observada a presença de calos na base das plântulas, havendo um aumento proporcional dos mesmos, à medida em que foi adicionado BAP ao meio de cultura, o que prejudicou o desenvolvimento das plântulas, retardando relativamente o desenvolvimento das brotações e o das raízes, resultando em plântulas menores, e certamente, mais susceptíveis ao estresse na fase de aclimação

Especula-se que o nível endógeno de auxina da espécie pode ter sido suficiente para balancear com a adição do BAP (citocinina), resultando na formação dos calos.

Em algumas plântulas do tratamento que continha 1,0mg/L de BAP, folhas apresentavam sinais de vitrificação e a formação de calos em algumas raízes.

O desenvolvimento das plântulas, avaliado aos 30 dias, pode ser visualizado na Figura 5.



FIGURA 5. Efeito do meio MS suplementado com BAP de plântulas provenientes de segmentos nodais de *Tridax procumbens*, aos 30 dias de cultivo in vitro. 1) plântulas cultivadas em meio MS sem regulador de crescimento; 2) plântulas cultivadas em meio MS+0,5mg/L; 3) plântulas cultivadas em meio MS+1,0mg/L. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Experimento II

Neste experimento, o BAP foi mais eficiente do que o TDZ em todas as variáveis analisadas.

Para a variável altura das plântulas, os maiores valores das médias apresentadas foram obtidos à medida que ocorria a redução da concentração de BAP no meio, sendo 2,6cm para a concentração de 0,125mg/L e 0,6cm para a concentração de 1mg/L (Figura 6 e Tabela 2). As dosagens usadas de TDZ não mostraram diferença significativa e as alturas das plântulas variavam de 0,18 a 0,58cm para a menor e maior altura, respectivamente.

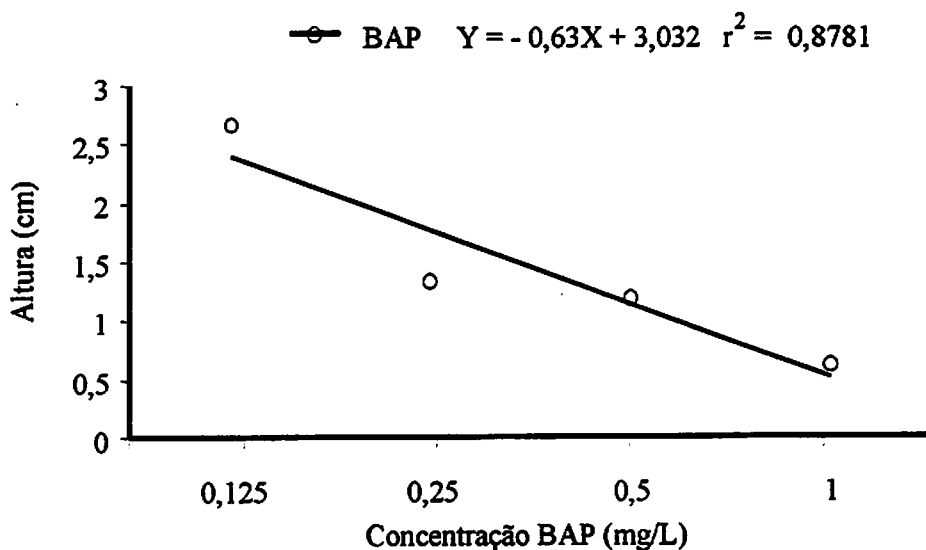


FIGURA 6. Altura da parte aérea (cm) a partir de segmentos nodais de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Tabela 2. Valores médios para altura (cm) de plântulas a partir de segmentos nodais de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de BAP e TDZ. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Regulador	Concentrações (mg/L)				Média geral
	0,125	0,25	0,5	1,0	
BAP *(1)	2,607	1,3418	1,1927	0,6273	1,442 a
TDZ *(2)	0,584	0,5725	0,1825	0,5450	0,471 b

Médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

*(1) $y = 3,032 - 0,63x$ $r^2 = 0,8781$

*(2) ns

Em *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae), a maior altura das plântulas foi conseguida em meio MS suplementado com 0,5mg/L de BAP e 0,4mg/L de ANA (Abreu, 1998). Estudos feitos por Anand et al. (1998) em *Uraria picta* Desv (Leguminosae) demonstram que a maior altura das plântulas foi obtida em

meio MS suplementado com BAP (0,25mg/L), obtendo-se 5,08 números de internódios; com 0,5mg/L foram obtidos 3,18 internódios e com 1mg/L de BAP, 3,0 internódios.

O mesmo ocorreu para a variável número de brotos, na qual o efeito do BAP foi mais satisfatório. O meio MS contendo 1mg/L de BAP apresentou maior valor médio, com 4,1 e, com a concentração de 0,125mg/L, o menor valor médio com 1,75. Nas demais concentrações, houve a formação de 2,0 brotos com concentração de 0,25 mg/L e 3,1 com concentração de 0,5mg/L. Não houve diferença significativa entre as dosagens usadas de TDZ, em que o número de brotos manteve a média de 1,04 (Figura 7 e Tabela 3).

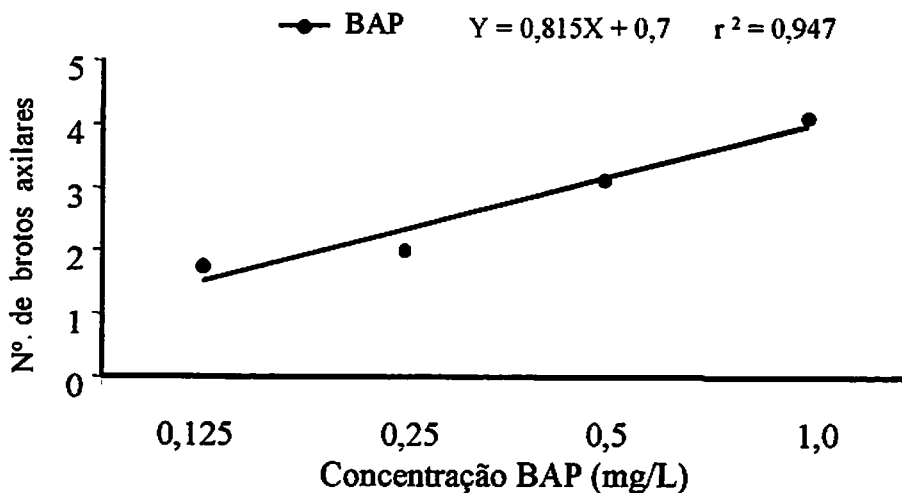


FIGURA 7. Número de brotos a partir de segmentos nodais de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras, MG, 1999.

TABELA 3 Médias para números de brotos em plântulas a partir de segmentos nodais de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de BAP e TDZ. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Regulador	Concentrações (mg/L)				Média
	0,125	0,25	0,5	1	
BAP *(1)	1,75	2,00	3,10	4,10	2,738 a
TDZ *(2)	1,15	1,3	0,65	1,05	1,037 b

Médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

*(1) $y = 0,7 - 0,815x$ $r^2 = 0,9470$

*(2) NS

Em quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*), BAP e TDZ nas concentrações de 0; 0,125; 0,25; 0,5; e 1,0mg/L formaram brotações em roseta e o melhor resultado foi obtido na concentração de 0,125mg/L de TDZ, cujas médias atingiram 5,0 brotos por explantes (Beker, 1997). Já Moreno, Amaral e Viana (1996), estudando a espécie *Phyllanthus carolinensis* L. (Euphorbiaceae), sugerem o meio MS suplementado com 0,25mg/L de BAP como adequado na indução de múltiplas brotações. Partlasarathy e Nagaraju (1995), trabalhando com *gerbera jamsoni* (Asteraceae) cv Gold Dust usando meio MS com diferentes doses de BAP (0; 0,25; 0,50; 0,75; e 1,0mg/L), obtiveram o maior número de brotos na concentração de 0,75mg/L.

Para a variável número de raízes, ocorreu diferença significativa dentro e entre os tratamentos. Observou-se uma diminuição do número de raízes nos tratamentos, à medida em que aumentou-se a concentração dos reguladores ao meio. Houve maior formação de calos na base das plântulas quando utilizaram-se as menores concentrações de TDZ no meio, diferindo do efeito de BAP no experimento anterior, em que o aumento da formação de calos na base das plântulas foi proporcional ao aumento das concentrações utilizadas.

Tanto o BAP quanto o TDZ possuem ação citocinínica, porém, sabe-se que a ação do TDZ é muito efetiva, atingindo um efeito tão superior ao BAP que

pode-se usar concentrações de 0,001 a 0,05mg/L e, também pode-se auxiliar na síntese de outras citocininas. O que pode ter acontecido neste experimento é que o desbalanço hormonal ou o nível endógeno de auxina da espécie tenha sido suficiente para interagir com suplementação do TDZ (citocinina) e formar os calos na base dos explantes. A dosagem mais eficiente do TDZ foi 0,125mg/L, na qual obteve-se a média de 3,0 raízes por explante, e a menos eficiente foi de 1mg/L, com 0,5 raízes. No tratamento com BAP, as concentrações mais e menos eficientes foram as de 0,125mg/L e 1mg/L, com médias de 6,9 e 2,6 raízes, respectivamente. Comparando as concentrações de BAP e TDZ para as variáveis de resposta, verificou-se que o BAP foi mais vantajoso (Figura 8 e Tabela 4).

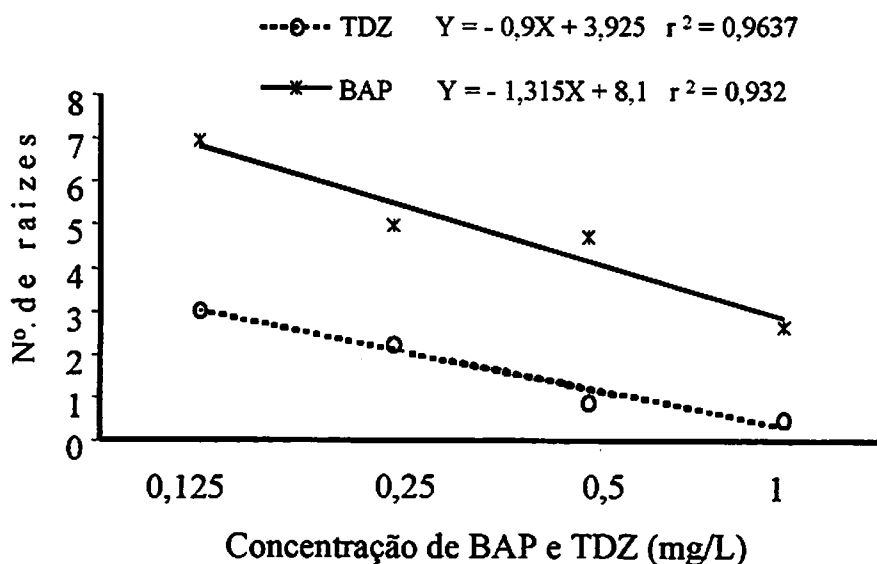


FIGURA 8. Número de raízes obtidas de plântulas a partir de segmentos nodais de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de BAP e TDZ. UFLA, Lavras, MG, 1999.

TABELA 4. Valores médios para número de raízes em plântulas a partir de segmentos nodais de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de BAP e TDZ. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Regulador	Concentrações (mg/L)				Média geral
	0,125	0,25	0,5	1	
BAP *(1)	6,95	4,95	4,7	2,65	4,812 a
TDZ *(2)	3,05	2,25	0,9	0,5	1,675 b

Médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

*(1) $y = 8,1 + 1,315x$ $r^2 = 0,9320$

*(2) $y = -3,925 + 0,9x$ $r^2 = 0,9637$

Resultado diferente foi encontrado em estudo feito com explantes caulinares de algaroba (*Prosopis juliflora* DC - Leguminosae) que, utilizando meio MS com dosagens individuais e combinadas em fatorial de ANA e BAP, obteve o melhor resultado no meio que continha 0,001mg/L de ANA. O meio contendo apenas BAP não proporcionou desenvolvimento do sistema radicular, porém, quando associado ao ANA, verificou-se o aparecimento de raízes pouco desenvolvidas (Rolim et al., 1995). Resultado semelhante ocorreu em *Canavalia brasiliensis* Mart. (Leguminosae-Pipilionoideae) que, quando cultivadas em meio MS adicionado com BAP desenvolveram somente plântulas anômalas, com pouco crescimento da parte aérea e/ou das raízes (Sato, Cavada e Esquibel, 1995). Porém em *Echinodorus cf scaber* foi observado que o BAP na concentração de 1,0mg/L foi o mais indicado para a formação de raízes, sendo que o menor número de raízes formado foi 5 e o maior 37 (Pereira, 1999). Sujatha e Reddy (1998), trabalhando com segmentos nodais e embriões de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae) em meio MS adicionado 1,0-10,0mg/L TDZ e 0,5-10,0mg/L BAP, também observaram a formação de calos na base dos explantes.

Com relação ao peso da matéria fresca e seca da parte aérea, o tratamento que continha BAP superou o que continha TDZ. Observou-se que, com concentrações de 0,125 a 0,5mg/L de BAP, o peso da matéria fresca e seca

da parte aérea tendeu a diminuir, tendo um pequeno acréscimo quando foi utilizada a concentração de 1,0mg/L (Figura 9 e Tabela 5, Figura 10 e Tabela 6)

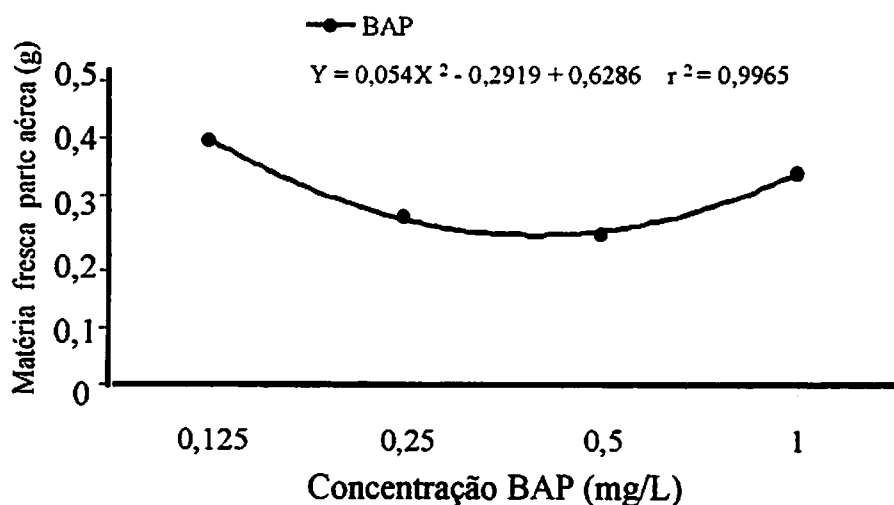


FIGURA 9. Peso da matéria fresca da parte aérea (g) a partir de segmentos nodais de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras, MG, 1999.

TABELA 5. Médias para matéria fresca da parte aérea (g) a partir de segmentos nodais de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de BAP e TDZ. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Regulador	Concentrações(mg/L)				Média geral
	0,125	0,25	0,5	1,0	
BAP *(1)	0,3897	0,2681	0,2403	0,3376	0,309 a
TDZ *(2)	0,1799	0,2164	0,2785	0,0829	0,189 b

Médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

*(1) $y = 0,6268 - 0,2919x + 0,0547x^2 \quad r^2 = 0,9965$

*(2) NS

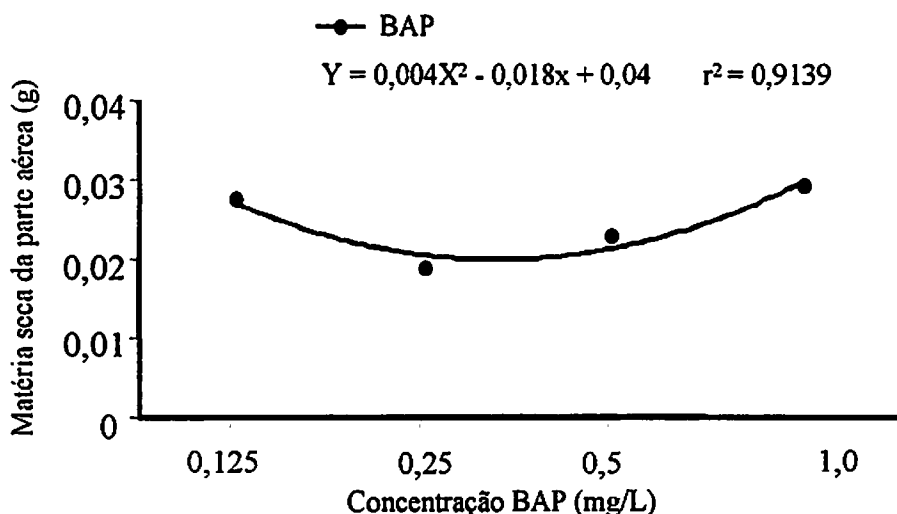


FIGURA 10. Matéria seca da parte aérea (g) a partir de segmentos nodais de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras, MG, 1999.

TABELA 6 Médias para matéria seca parte aérea (g) em plântulas a partir de segmentos nodais de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de BAP e TDZ. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Regulador	Concentrações (mg/L)				Média geral
	0,125	0,25	0,5	1,0	
BAP *(1)	0,027	0,0188	0,0228	0,029	0,025 a
TDZ *(2)	0,0141	0,0211	0,0137	0,0097	0,015 b

Médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

*(1) $y = 0,04 - 0,018x + 0,004$ $r^2 = 0,9139$

*(2) NS

Os resultados mostraram, portanto, que não há necessidade de utilizar regulador de crescimento no cultivo in vitro desta planta, pois os seus tecidos sintetizam quantidades de hormônios suficientes, fazendo com que seu crescimento com dominância apical forneça um número razoável de segmentos nodais.

2.6.3 Influência de intervalos de repicagem na produção de plântulas in vitro.

Na Figura 11 pode-se observar que o tempo de inoculação de 60 dias produziu um maior número de segmentos nodais e também uma maior média (9,7) de segmentos nodais por plântula (Tabela 7).

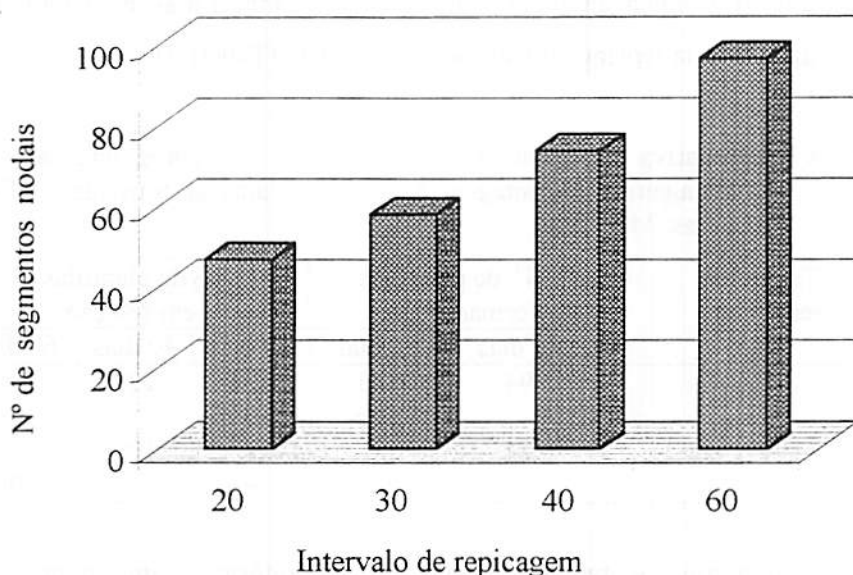


FIGURA 11. Produção total de segmentos nodais provenientes de dez plântulas cultivadas in vitro de *Tridax procumbens* aos 20, 30, 40 e 60 dias. UFLA, Lavras, MG, 1999.

TABELA 7. Produção de segmentos nodais provenientes de plântulas cultivadas in vitro de *Tridax procumbens* aos 20, 30 e 40 e 60 dias. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Intervalo de repicagem	Número total de segmentos nodais	Número de segmentos nodais/ plântula
20	47	4,7
30	58	5,8
40	74	7,4
60	97	9,7

Entretanto, quando analisou-se o número total de plântulas formadas após o período de inoculação, estimou-se que ele poderá ser maior no intervalo de 20 dias, pois num período de 40 dias poderão ser realizadas duas repicagens de 20 dias, proporcionando 27% a mais de plântulas do que uma repicagem realizada somente aos 40 dias. Estimou-se que num período de 60 dias poderão ser realizadas três repicagem de 20 dias, obtendo-se 45% a mais de plântulas do que com apenas uma repicagem realizada aos 60 dias (Tabela 8).

TABELA 8. Estimativa de plântulas formadas em diferentes intervalos de repicagem e percentagem a mais de plântulas formadas. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Tempo de repicagem (dias)	Nº. de plântulas formadas após		% de plântulas em relação		
	40 dias	60 dias	30 dias	40 dias	60 dias
20	94	141	121	127	145
30	-	116	100	-	119
40	74	-	-	100	-
60	-	97	-	-	100

O intervalo de repicagem em um laboratório é importante para determinar o número de plântulas formadas, o qual também influencia economicamente no custo da muda.

Além da estimativa de obter-se o maior número de plântulas com repicagem realizada aos 20 dias, neste período as plântulas apresentam-se mais vigorosas quando comparadas com as plântulas com 60 dias de cultivo, as quais apresentaram sinais de senescência.

CONCLUSÕES

Nas condições em que os trabalhos foram realizados, conclui-se que:


- como fonte de explante, os segmentos nodais são eficientes para se estabelecer a planta in vitro;
- o meio MS na concentração de 50% foi o mais eficiente para se obter a maior altura de plântulas e peso da matéria fresca, o que é altamente vantajoso pois diminuem-se os custos de produção de mudas;
- a espécie *Tridax* não exibiu hábito de crescimento em roseta, tendo apresentado um melhor tipo de propagação através de alongamento;
- o melhor período para se fazer a repicagem foi aos 20 dias, obtendo-se um maior número de segmentos nodais.

2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, I.N. de Propagação “in vivo” e “in vitro”, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides*. Lavras: UFLA, 1998. 113p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- ALVES, J.M.C. Cultivo “in vitro” de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam. Lavras: UFLA, 1998. 82p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- ANAND, A.; RAO, C.S.; LATHA, R. et al. Micropropagation of *uraria picta*, a medicinal plant, through auxillary bud culture and callus regeneration, *In vitro cellular e developmental biology*, Columbia, v.34, p.136-140, april./june, 1998.
- ARELLO, E.F.; PINTO, J.E.B.P. Propagação in vitro de *Kielmeyera coriacea*. I. Efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético na multiplicação de brotos, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.28, n.1, p.25-31, jan. 1993.
- ATTA, A.H.; VAN, S.J. Micropropagation and establishment of *Yucca aloifolia* Plant Cell, Tissue And Organ Culture, Netherlands, v.48, n.3, p.209-212, 1997.
- BECKER, L. Propagação vegetativa “in vivo” e “in vitro”, indução de calos, nutrição, extração e quantificação de alcalóides nas espécies *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. (Quebra-pedras). Lavras: UFLA, 1997. 96p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- CALDAS, L.S. ; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In, TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. eds. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998, p. 87-132.
- CHEN, P.K.; HUA, H.; YIN, J.W. Enhanced syntesis of natural phytotoxin artemisinin in tissue culture. *Plant Growth Regulator Society Of America Quarterly*, USA, v.21, n.3, p.151-160, 1993.
- DUSKOVA, J.; DUSEK, J. *Leuzea Carthamoides* DC. in vitro *Herba Polonica*, Czech Republic, v.41, n.4, p.165-169, 1995.



- FARIAS, J.L. de; PINTO, J.E.B.P.P.; LAMEIRA, O.A. Estabelecimento *in vitro* de arnica silvestre (*Solidago microglossa* DC.) In: SEMINÁRIO MINEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS UFLA, 2., 1996, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1996. p.33.
- FELLMAN, C.D.; READ, P.E.; HOSIER, M. A Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation. **HortScience**, Alexandria, v.22, n.6, p.1197-1200, Dec. 1987.
- FIDÉLIS, I. Micropropagação de mama-cadela (*Brosimum guadichaudii* Tréc.): uma espécie medicinal. Lavras: UFLA, 1998, 120p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- FRANÇA, S.C.; BERTONI, B.W.; PEREIRA, A.M.S. Antihepatotoxic agent in micropropagated plantlets of *Eclipta alba*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.40, n.3, p.297-299, 1995.
- GEORGE, E.F. Plant propagation and micropropagation. In: GEORGE, E.F. (ed.). **Plant propagation by tissue culture: part 1 the technology**. 2.ed. Somerset: Exegetics, 1993. cap.2, p.37-66.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. (eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-170.
- HASEGAWA, T.; YABE, K.; MORITA, M. Production system of micropropagated nursery by tissue culture in Japanese butterbur.III. In vitro preservation of cultured plants on modified MS and medium containing growth regulator. **Research Bulletin of the Aichi ken Agricultural Research Center**, Japan, n.27, p.159-166, 1995.
- KERIHO, J.M.; NAKAJIMA, S.; BABA, N. et al. A plant growth regulator from *Vernonia auriculifera* **Zeitschrift fur Naturforschung. Section C, Biosciences**, Japan, v.50, n.5/6, p.455-458, 1995.
- LE, C.L. In vitro multiplication of *Arnica montana* L.. **Revue Suisse de Viticulture d'arboriculture et d'horticulture**, Nyon, v.26, n.6, p.391-395, 1994.
- LEE, C.W.; NICHOLS, J.T.; WANG, L. et al. Plant regeneration in *Coreopsis lanceolata* L. from leaf tissue cultures. **HortScience**, Alexandria, v.29, n.11, p.1353-1354, nov.1994.



LU, C.Y. The use of thidiazum in tissue culture. *In Vitro Cell Development Biology*, Columbia, v.92, n.2, p.92-96, 1993.

LUZ, J.M.Q.; PINTO, J.E.B.P.; EHLERT, P.A.D. et al. Indução *in vitro* de embriões em anteras de pimentão. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.16, n.1, p.56-60, maio, 1998.

MALARZ, J.; STOJAKOWSKA, A.; DOHNAL, B. et al. Helenalin acetate in vitro propagated plants of *Arnica montana* *Planta Médica*, Poland, v.59; n.1, p.51-53, 1993.

MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E. et al. Biological and biochemical effects of cytokin-active phenylurea derivates in tissue culture systems. *HortScience*, Alexandria, v.22, n.6, p.1194-1197, Dec. 1987.

MORENO, F.N.; AMARAL, L.V.; VIANA, A. M. Indução de calos "in vitro" em diferentes espécies de *Phyllanthus* In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15. 1996, Florianópolis. *Anais...Florianópolis: UFSC, 1996. p.228.*

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.

NIN, S.; SCHIFF, S.; BENNICI, A.; MAGHERINI, R. In vitro propagation of *Artemisia absinthium* L. *Advances in Horticultural Science*, v.8, n.3, p.145-147, 1994.

PANIEGO, N.B.; GIULIETTI, A. M. *Artemisia annua* L.: dedifferentiated and differentiated cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v.36, n.2, p.163-168, 1994.

PARTHASARATHY, V.A.; NAGARAJU, V. Morphogenetic response of gerbera shoot to benzyl amino purine. *Annals of Plant Physiology*, v.9, n.1, p.10-12, 1995.

PASQUAL, M.; BARROS, I. Efeitos do ácido naftalenoacético e 6-benzinoaminopurina sobre a proliferação de brotos *in vitro* em Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v 27, n.7, p. 1017-1019, jul. 1992.

- PEREIRA, F.D. Propagação *in vitro* e identificação de metabólitos secundários em chapéu de couro, (*Echinodorus cf scaber* Rataj), uma planta medicinal. Lavras: UFLA, 1999. 112 p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 344p.
- PINTO, J.E.B.P.P.; ARELLO, E.F.; PINTO, C.A B.P.; BARBOSA, M.H. Uso de diferentes explantes e explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.29, n.6, p 867-873, jun. 1994.
- PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Uberlandia, v.1, n.4, p.12-15, jan/fev, 1998.
- ROLIM, F.P.O.; BARBOSA, L.; CÂMARA, F.A .A .et al. Enraizamento de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW.) DC.) *In Vitro* em Meio Murashige & Skoog modificado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras Anais... Lavras: UFLA, 1995. p.176.
- SALEH, E O.; SHEPHERD, S.L.K. Estudos de germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Clusia nemorosa* (Guttiferae) In: Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, 3.,1997, Campinas. Resumos...Campinas: CPQBA - UNICAMP, 1997. p.67.
- SATO, A. Y. Propagação de gérbera de de vaso através da cultura de tecidos. Lavras: ESAL, 1994. 95p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- SATO, A. ; CAVADA, B.S.; ESQUIBEL, M.A . Determinação de Fitoemaglutinas em Cultura de Tecidos de *Canavalia brasiliensis* Mart. In; CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5. 1995, Lavras. Anais... Lavras: UFLA, 1995. p.187.
- SILVA, M.L.B.; MORENO, F.N.;VIANA, A M. Micropropagação de *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15.,1996. Florianópolis. Anais...Florianópolis: UFSC, 1996. p.228.
- SINGH, I.P.; TALWAR, K.K.; ARORA, J.K. et al. Biologically active guaianolide from *Saussurea lappa*. **Phytochemistry**, India, v.31,n.7, p. 2529-2531, 1992.

SUJATHA, M.; REDDY, T.P. Differential cytokinin effects on the stimulation of vitro shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.). **Plant Cell Reports**, New york, n.18, p.561-566. 1998.

THOMAS, J.C.; KATTERMAN, E.R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. **Plant Physiology**, Washington, v.81, n.2, p.681-683, June 1986.

Capítulo 3

CALOGÊNESE E CRESCIMENTO CELULAR
EM *Tridax procumbens* L.

RESUMO

CERQUEIRA, E.S. Calogênese e crescimento celular em *Tridax procumbens* L. Lavras: UFLA, 1999. 81p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Agricultura da UFLA, com intuito de definir o melhor tipo e fonte de explante para indução de calos e a determinação da curva de crescimento celular em *Tridax procumbens* L.. Foram utilizados segmentos foliares cultivados in vivo e in vitro e de segmentos caulinares de plântulas estabelecidas in vitro em meio de cultura sólido (0,6%) de Murashige & Skoog (MS) com 3% de sacarose e pH 5,7 suplementado com 1; 2 e 4mg/L de 2,4-D; AIB e ANA interagidos com 2,0mg/L de BAP individualmente na presença de luz. Segmento foliar foi mais eficiente para a indução dos calos na presença de 2,0mg/L de BAP+2,0 mg/L de ANA. As folhas oriundas de plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação foram desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos e imersas em hipoclorito de sódio comercial a 30% sob agitação por 10 minutos. Posteriormente, foram lavadas por cinco vezes em água destilada e autoclavada em câmara de fluxo laminar e então excisadas e inoculadas em meio de cultura MS suplementado com 2,0mg/L de BAP+2,0mg/L de ANA. Os explantes foram mantidos na presença ou não de luz, sendo que maior ganho de matéria fresca foi alcançado em explantes provenientes do cultivo in vivo e acondicionado no escuro. A curva de crescimento celular foi conduzida através do peso de matéria fresca e seca dos calos formados em meio MS contendo 2,0 mg/L de BAP+2,0mg/L de ANA mantidos no escuro. As avaliações porcentagem de indução, peso de matéria fresca e seca e coloração dos calos formados foram realizadas aos 30 dias e a curva de crescimento no período de 39 dias. Foram encontradas diferenças entre estruturas anatômicas nos cortes histológicos efetuados nos tecidos dos explantes oriundos do cultivo in vivo e in vitro.

Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador) e Evaristo Mauro de Castro – UFLA.

ABSTRACT

CERQUEIRA, E.S. Callogenesis and cell growth in *Tridax procumbens* L.
Lavras: UFLA, 1999. 81p (Dissertation – Master in Plant Physiology).

The works were conducted in Biotechnology Laboratory of Department of Agriculture of the UFLA, with the purpose of defining the best sort and source of explant for callus-inducing and deterring the cell growth curve in *Tridax procumbens* L. Leaf segments grown both in vitro and in vivo and stem nodal segments from seedling established in vitro in solid culture medium (0,6%) of Murashige & Skoog (MS) with 3% of sucrose and pH 5.7 supplemented with 1; 2 and 4mg/L of 2,4-D; AIB and ANA interacted with 2,0mg/L of BAP, singly, in the presence of light were employed. Leaf segment was more efficient for inducing calluses in the presence of 2,0mg/L of BAP + 2,0mg/L of ANA. The leaves from parent plants grown in greenhouses were disinfected in 70% alcohol for 30 seconds and immersed in 30% commercial sodium hypochloride under stirring for 10 minutes. Afterwards, they were washed for five times in distilled water and autoclaved in laminar flux chamber and then excised and inoculated in MS culture medium supplemented with 2,0mg/L of BAP + 2,0mg/L of ANA. The explants were maintained in presence or not of light, the greatest dry matter gain achieved in explants coming from the in vivo culture and acconditioned in the dark. The cell growth curve was conducted through the weight of the fresh and dry weight of the calluses formed in MS medium containing 2,0mg/L of BAP + 2,0mg/L of ANA kept in the dark. The evaluations: induction percentage, weight of fresh and dry matter weight and coloration of the calluses formed were proceeded at 30 days and the growth curve in the 39 day period. Differences among the anatomical structures in the histological section undertaken in tissues of the explants coming from the in vivo and in vitro cultivation were found.

Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Major Professor) and Evaristo Mauro de Castro - UFLA.

3.3 INTRODUÇÃO

Tridax procumbens é uma planta herbácea, pertencente à família das Asteraceas e conhecida popularmente como erva-de-touro ou margaridinha. Em extratos da espécie analisados fitoquimicamente, foi descrita a ocorrência de várias substâncias, as quais lhe conferem suas atividades medicinais.

O metabolismo secundário se manifesta em células e tecidos específicos em determinados estágios de crescimento de plantas superiores, sendo que a expressão deste metabolismo está intimamente correlacionada com o crescimento e a diferenciação morfológica de células.

O crescimento de calos é desejável para induzir variação somaclonal e estudos fisiológicos, principalmente quando se deseja relacionar a presença de metabólitos secundários com o crescimento celular. A indução de calos geralmente está relacionada com a utilização de reguladores de crescimento e regulada pela razão adequada de auxina e citocinina.

Calos podem ser multiplicados por sucessivas subculturas, mantidos in vitro por longos períodos e são de grande importância para estudos morfogenéticos in vitro e através da suspensão de células para a obtenção de produtos secundários, incluindo fármacos, representando uma biotecnologia de grande interesse científico e comercial.

Este trabalho teve como objetivo avaliar influência de reguladores de crescimento na formação de calos, assim como estabelecer a curva de crescimento celular para *Tridax procumbens*.

3.4 REFERENCIAL TEÓRICO

Uma massa de células desorganizadas, denominada calo, é uma resposta comum quando um tecido cultivado *in vitro* passa por injúrias físicas ou químicas, podendo se diferenciar em órgãos ou tecidos.

Para a indução de calos, praticamente qualquer parte da planta, pode ser utilizada como explante, entretanto, tecidos e órgãos contendo células não diferenciadas, como as que ocorrem em ápices caulinares, gemas axilares e regiões meristemáticas, são mais adequados (Handro e Floh, 1990; Flick et al., 1986).

Vários fatores relacionados com o explante interferem na calogênese, como: o tamanho do explante, composição do meio de cultura e reguladores de crescimento, órgão fornecedor do explante, a idade e a época do ano em que é colhido e genótipo da planta doadora. A frequência de sobrevivência e a velocidade de desenvolvimento dos calos estão diretamente relacionadas com o seu tamanho inicial (Murashige, 1974).

Durante o estabelecimento do calos ocorrem três fases: indução, divisão e diferenciação celular. Na fase de indução, as células preparam-se para a divisão, o metabolismo é ativado e as células permanecem com o tamanho constante. A duração desta fase irá depender do estado fisiológico das células. Durante a divisão celular, ocorre a dediferenciação das células para características parenquimáticas, resultando na formação de crescimento padrão (Aitchison, Macleod e Yeoman, 1977).

O crescimento e o desenvolvimento (diferenciação celular) do calos podem ser verificados pela curva de crescimento que geralmente apresenta cinco fases distintas: fase lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. A fase lag se caracteriza como fase de maior produção de energia; a fase exponencial como a fase biossintética; a fase linear, de diminuição da divisão celular, mas de

aumento de volume celular; a fase de desaceleração é o momento em que as culturas devem ser transferidas para outro meio, devido a redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos, secagem do ágar e redução do oxigênio (O₂) no interior das células e, por último, a fase estacionária, quando ocorre maior acúmulo de metabólitos secundários, segundo Smith (1992).

Quando cultivados por várias semanas, alguns calos apresentam sinais de desaceleração do crescimento, necrose, coloração marrom e, finalmente, dessecação. Este fato pode ocorrer em função de alguns fatores como a exaustão de nutrientes, inibição da difusão de nutrientes, evaporação acompanhada pelo aumento na concentração de alguns constituintes do meio e acúmulo de metabólitos, os quais podem ser tóxicos (Constabel e Vasil, 1987).

3.4.1 Calos e reguladores de crescimento

A dediferenciação, ou seja, a reversão de células adultas à células juvenis pode ocorrer, levando a um processo de intensa multiplicação celular. Esse processo é mais lento do que quando são utilizadas células não diferenciadas e também mais dependente de reguladores de crescimento e de condições ambientais, principalmente luz e temperatura (Pierik, 1989).

Várias espécies de plantas medicinais tem sido submetidas a experimentos de indução de calos utilizando reguladores de crescimento (Lameira, Costa e Pinto, 1994; Becker, 1997; Abreu, 1998; Lameira, 1997; Kajiki, 1996).

Geralmente, concentrações semelhantes de auxina e de citocinina no meio promovem a formação de calos, mas isso varia em função do balanço hormonal de cada espécie. Tisserat (1985), em seu estudo, comprovou que a produção de calos pode ser induzida apenas pela adição de auxina, entretanto, quando adicionou citocinina aumentou a proliferação do mesmo.

Porém, o uso da 2,4-D tomou-se limitado devido a possibilidade de induzir mutações, ao mesmo tempo que pode inibir a fotossíntese, o que não foi descrito em outras auxinas como a ANA, AIB e AIA (Pierik, 1989).

Espécies da família Asteraceae têm sido induzidas à formação de calos com ajuda de reguladores de crescimento. Duskova e Dusek (1995), utilizando raízes e parte aérea de *Leuzea carthamoides* DC. (Asteraceae), observaram que os calos de parte aérea desenvolveram-se melhor com 0,5mg/L de AIB, obtendo-se 544% de aumento no peso da matéria fresca após quatro semanas. A cultura de calos obtida das raízes cresceram bem menos, sendo que o melhor resultado obtido foi com 1mg/L de 2,4-D e 1mg/L de BAP com 230% no aumento do peso fresco.

Melhor indução de calos foi obtida por Paniego e Giulietti (1994) trabalhando com a espécie *Artemisia annua* L. (Asteraceae) em meio MS com 30g/L de sacarose e 100mg/L de mio-inositol e 4,5µM de 2,4-D ou 5,4µM de ANA. O uso de 2mg/L de 2,4-D e 2mg/L de BAP apresentou-se como significativo na produção de calos derivados de hipocótilos de *Cassia acutifolia* (Leguminosae-Caesalpomioideae) nos trabalhos de Rady e Nazif (1997).

Uma grande quantidade de calos foi obtida através de sementes de *Pinellia pedatisecta* Schott. (Araceae) cultivadas em meio B5 e MS suplementados com 0,5 a 6mg/L de 2,4-D e 0,5mg/L de BA. Os calos cresceram rapidamente e tiveram consistência friável. Já o meio MS suplementado com 0,1 a 4mg/L de ANA e 0,5mg/L de BA influenciou na frequência de diferenciação, tendo havido aumento de calos com a diminuição da concentração de ANA, segundo Baocheng et al. (1995).

A indução da formação de calos foi alcançada em *Rauwolfia caffra* Sond. (Leguminosae-Apocynaceae) a partir de folhas em meio MS usando diferentes concentrações de ANA (0,5 a 2mg/L) em combinação com BAP (0,5 a 2mg/L) em estudos realizados por Upadhyay et al. (1992) e encontraram

melhor resposta quando utilizadas concentrações de 2mg/L de ANA e BAP. Os calos possuíam aspecto compacto e ligeiramente amarelo.

Não foram encontrados relatos na literatura científica sobre o uso de reguladores de crescimento na indução de calos e caracterização da curva de crescimento celular de *Tridax procumbens* L.

3.5 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Agricultura e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras, MG.

3.5.1 Efeito de diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes na indução de calos de *Tridax Procumbens* L

Segmentos de folhas de aproximadamente 1cm^2 bem como segmentos internodais com 0,8cm de comprimento, foram excisados de plântulas estabelecidas “in vitro” com auxílio de pinça e bisturi em câmara de fluxo laminar. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio de vidro (25 x 150 mm) contendo 15mL de meio de cultura MS, com 0,6% de ágar e 3% de sacarose suplementados com concentrações 1; 2 e 4mg/L dos reguladores de crescimento 2,4-D; ANA e AIB, individualmente, acrescidos com 2,0mg/L de BAP. O pH dos meios foi ajustado para $5,7\pm 0,1$ antes da autoclavagem a 121°C por 15 minutos. Os tubos de ensaio foram vedados com tampa plástica e suas bordas protegidas com parafilme.

Após a inoculação, os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura de $26^\circ\text{C}\pm 1$ na presença de luz, sendo o fotoperíodo de 16 horas de luz sob $25\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de irradiância.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial $3\times 3\times 2$, com três reguladores de crescimento em três concentrações e dois tipos de explantes com 5 repetições, cada parcela composta por 4 tubos. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, utilizando os níveis de significância de 1% para o teste F.

Aos 30 dias, avaliou-se a porcentagem de área coberta com calos, coloração, peso da matéria fresca e seca dos calos formados. Para as avaliações

da área dos explantes coberta com calos e coloração, três avaliadores atribuíram notas 1; 2; 3 e 4 para os explantes que apresentavam, respectivamente, 25; 50; 75 e 100% da área coberta com calos e notas 1; 2; 3 e 4 para os explantes que apresentavam com coloração verde claro, verde escuro, amarelo e marrom.

3.5.2 Diferenças na indução de calos em fontes de explantes obtidas in vitro e in vivo.

Os calos foram induzidos a partir de folhas jovens retiradas de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação e de folhas obtidas de plântulas estabelecidas in vitro. As folhas obtidas in vivo foram desinfestadas da seguinte forma: lavagem em água corrente por 40 minutos, logo após foram imersas em álcool 70% por 30 segundos e em hipoclorito de sódio comercial a 30% sob agitação por 10 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, as folhas foram lavadas por cinco vezes em água destilada e autoclavada e, em seguida, excisadas no meio da nervura central com aproximadamente 1cm^2 e os explantes foram inoculados em tubo de ensaio de vidro (25 x 150mm) contendo 15mL de meio de cultura básico MS com 0,6% de ágar e 3% de sacarose suplementado com 2,0mg/L de BAP e 2,0mg/L de ANA.

O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7\pm 0,1$ antes da autoclavagem. Os tubos contendo os explantes foram vedados com tampa plástica e suas bordas protegidas com parafilme e mantidas em sala de crescimento na presença e ausência de luz, sendo que o fotoperíodo para o tratamento com luz, foi de 16 horas luz sob $25\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de irradiância e sob temperatura de $26\pm 1^\circ\text{C}$.

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições, sendo cada parcela composta por 4 tubos. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, utilizando os níveis de significância de 1% para o teste F.

Aos 30 dias, avaliou-se a porcentagem de área coberta com calos, peso da matéria fresca e seca dos calos formados. Para as avaliações da área dos explantes coberta com calos, três avaliadores atribuíram nota 1, 2, 3 e 4 para os explantes que apresentavam 25; 50; 75 e 100% da área coberta com calos

3.5.3 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de *Tridax procumbens* L.

Folhas de plântulas de *Tridax procumbens* estabelecidas in vitro foram utilizadas como fonte de explantes. Segmentos de folhas de aproximadamente 1cm² foram excisados e inoculadas em meio MS com 0,6% de ágar e 3% de sacarose, suplementado com 2mg/L de BAP+2,0mg/L de ANA. Três explantes foram acondicionados em frasco com capacidade para 150mL contendo 30mL de meio os quais foram acondicionados em sala de crescimento em ausência de luz e a 25°C.

Para a determinação da curva de crescimento, os calos foram pesados em intervalos de 3 dias. Primeiramente foi realizada a determinação do peso da matéria fresca dos calos formados e, após 36 horas de acondicionamento em estufa a 45°C, foi determinado o peso da matéria seca dos mesmos. Cada pesagem foi proveniente de 4 frascos retirados ao acaso.

3.5.4..Diferenças na estrutura celular de fontes de explantes cultivados “in vitro” e “in vivo”.

Foram coletadas amostras de folhas de plantas provenientes de casa de vegetação e de plântulas estabelecidas “in vitro”, para a realização de cortes histológicos para verificação de possíveis diferenças entre estas. As folhas foram fixadas em solução F.A.A (5% formol, 5% ácido acético glacial e 90% de álcool

etílico 70%) segundo a metodologia descrita por Johansen, (1940) por 72 horas e, posteriormente, conservadas em álcool 70° GL.

Para o preparo de lâminas permanentes, foram utilizadas as técnicas usuais de inclusão em parafina após desidratação em série alcóolica, etílica (Johansen, 1940; Sass, 1951). Os cortes do material foram efetuados com o auxílio de micrótomo rotativo, em séries orientados transversalmente e submetidos ao processo de coloração com safranina-azul de astra, (Bukatsh, 1972). Foram efetuados também em material cultivado in vivo, cortes à mão livre com o auxílio de lâmina de barbear e inclusão do material em isopor, sendo estes submetidos a clarificação em solução 20% de hipoclorito de sódio, produto comercial por um período de três a cinco minutos. Em seguida, os cortes foram neutralizados com a solução a 5% de ácido acético por um minuto. A coloração foi efetuada com imersão em corante verde iodo-acético por dois a três minutos, seguindo-se de três lavagens em água destilada e imersão em corante vermelho congo por três a cinco minutos, repetindo-se as lavagens (Dop e Gautié, 1907).

O material foi fotografado e, a partir das análises visuais na região mediana das secções transversais da folha na nervura principal, pôde-se observar as alterações nas características citológicas.

3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.6.1 Efeito de diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes na indução de calos de *Tridax procumbens*.

Segmentos foliares e caulinares quando foram inoculados em meio MS suplementado com reguladores de crescimento do grupo auxina (2,4-D, AIB e ANA) e uma citocinina (BAP) mostrou-se induzir a divisão celular, ou seja, formação de calos. O melhor resultado para a indução de calos nos segmentos foliares foi 2,0mg/L de ANA+2,0mg/L de BAP com 100% de área coberta com calos. Em meios com concentrações de 1,0mg/L de ANA, AIB e 2,4-D; 2,0mg/L de 2,4-D e AIB e 4,0mg/L de AIB e ANA, mostraram-se apenas 25% de área coberta com calos, e com a concentração 4,0mg/L de 2,4-D. não houve desenvolvimento de calos nos segmentos foliares

Já para os segmentos caulinares, o melhor resultado foi obtido com 1,0 mg/L de ANA + 2,0mg/L de BAP o qual proporcionou 75% de área coberta com calos, seguido por 2,0mg/L de AIB e 4,0mg/L de ANA com 50% .As concentrações 1 e 2,0mg/L de 2,4-D; 2,0mg/L de ANA e 4,0mg/L de AIB obtiveram apenas 25% de área coberta. Não ocorreu a formação de calos com 1,0mg/L de AIB e 4,0mg/L de 2,4-D. Esses resultados podem ser melhor visualizados na Figura 12 e 13.

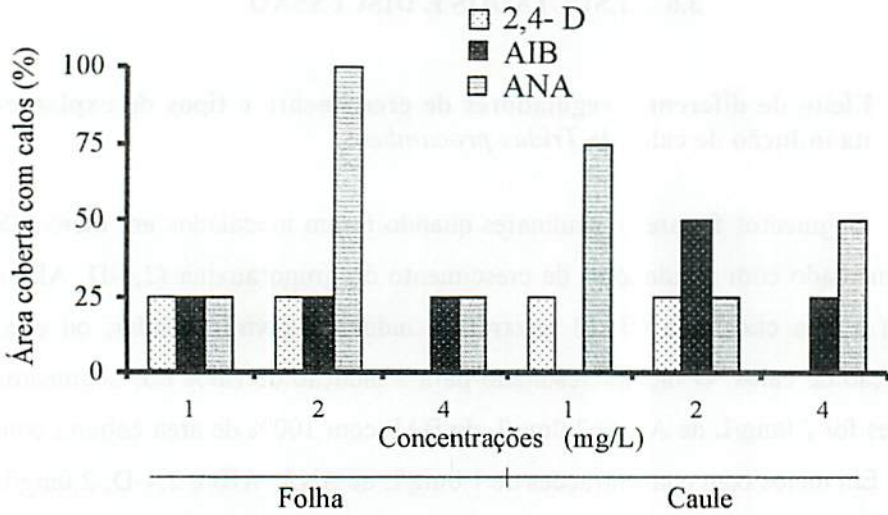


FIGURA 12. Porcentagem de indução da área coberta com calos formados a partir de segmentos foliares e caulinares de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, AIB e ANA acrescidos com BAP. UFLA, Lavras, MG, 1999.

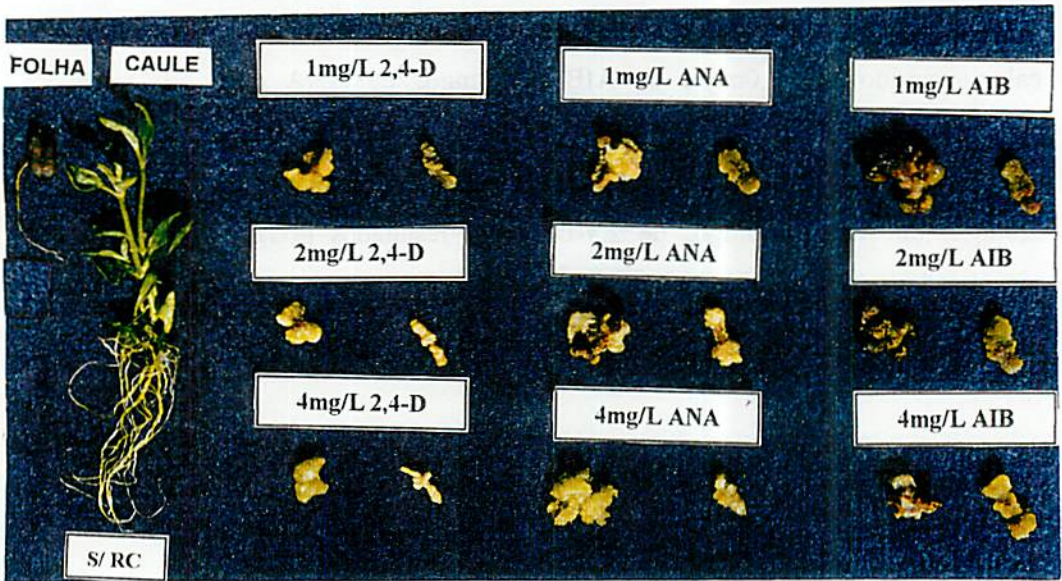


FIGURA 13. Segmentos foliares e caulinares de *Tridax procumbens* avaliados aos 30 dias, em diferentes concentrações de 2,4-D, ANA e AIB, interagindo com 2mg/L de BAP. UFLA, Lavras, MG, 1999.

O melhor resultado apresentado para o ganho de matéria fresca dos calos formados em segmentos foliares foi de 1,4g com ANA na concentração de 2,0mg/L + 2,0mg/L de BAP. Concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0mg/L de AIB obtiveram valores de 1,098; 0,865 e 0,804g e, com as mesmas concentrações de 2,4-D, foram alcançados menores valores, de 0,468; 0,215 e 0,211g, mostrados na Figura 14 e Tabela 9.

x 2,4-D	$Y = 0,1125X^2 - 0,63X + 0,97$	$r^2 = 1$
• AIB	$Y = 0,086X^2 - 0,49X + 1,503$	$r^2 = 1$
▲ ANA	$Y = 0,071X^2 + 3,23X - 2,19$	$r^2 = 1$

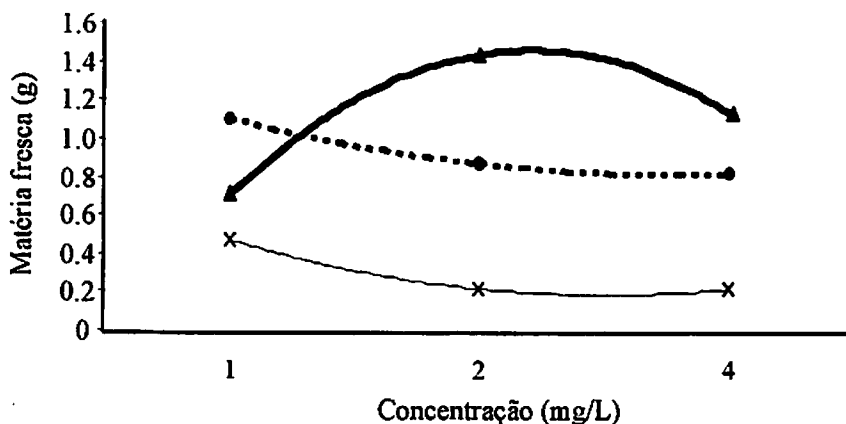


FIGURA 14. Peso de matéria fresca dos calos formados a partir de segmentos foliares de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, AIB e ANA acrescidos com BAP. UFLA, Lavras, MG, 1999.

TABELA 9. Valores médios de peso de matéria fresca dos calos formados a partir de segmentos foliares e caulinares de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, AIB e ANA acrescidos com BAP.

EXPLANTE	REGULADOR CRESCIMENTO	NIVEIS (mg/L)			MÉDIA
		1	2	4	
Folha a	2,4-D	0,468 c	0,215 c	0,211 c	0,298 c
	AIB	1,098 a	0,865 b	0,804 b	0,922 b
	ANA	0,707 b	1,431 a	1,110 a	1,083 a
Caulé b	2,4D	0,199 b	0,103 b	0,211 a	0,171 b
	AIB	0,287 ab	0,613 a	0,335 a	0,412 a
	ANA	0,407 a	0,185 b	0,345 a	0,312 a

Médias seguidas por letras minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Quanto aos valores do peso da matéria fresca dos calos formados a partir dos segmentos caulinares, o AIB na concentração de 2,0mg/L superou as demais com valor de 0,613g. Com as concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0mg/L de ANA obtiveram-se valores de 0,407; 0,185 e 0,345g. Nesta variável, como nos segmentos foliares, as mesmas concentrações de 2,4-D também mostraram menores valores, que foram de 0,199; 0,103 e 0,211g, como mostram a Figura 15 e Tabela 9

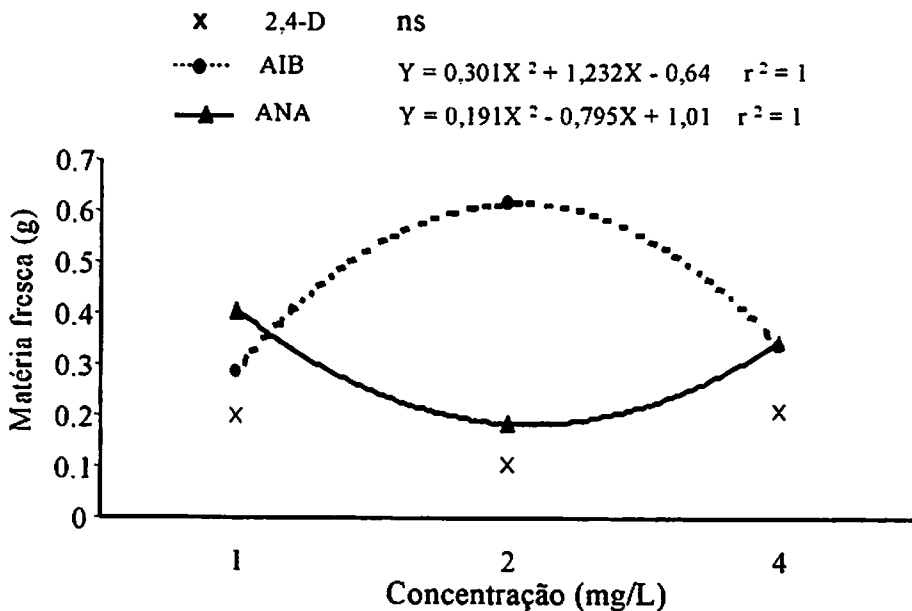


FIGURA 15. Peso de matéria fresca dos calos formados a partir de segmentos caulinares de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, AIB e ANA acrescidos com BAP. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Observou-se que, para segmentos foliares e caulinares, os tratamentos que resultaram em maior crescimento foram aqueles que tinham a mesma concentração de auxina e citocinina, ou seja, com 2,0mg/L.

É importante a determinação do peso da matéria seca, pois com ele podemos fazer uma relação com o peso da matéria fresca e estabelecer o quanto de água havia no material analisado.

De acordo com a Figura 16 e Tabela 10, notou-se que o melhor resultado para incremento de matéria seca de calos formados em segmentos foliares foi obtido com 1,0mg/L de AIB com 0,088g, seguido por 2,0mg/L de ANA com 0,083g.

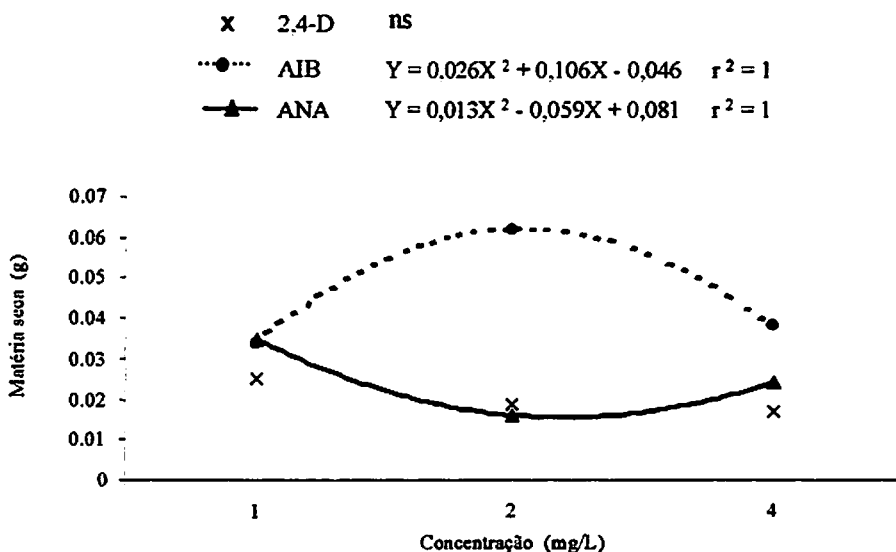


FIGURA 16. Peso da matéria seca dos calos formados a partir de segmentos foliares de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, AIB e ANA acrescidos com BAP. UFLA, Lavras, MG, 1999

TABELA 10 Valores médios para peso de matéria seca dos calos formados a partir de segmentos foliares e caulinares de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, AIB e ANA acrescidos com BAP.

EXPLANTE	REGULADOR CRESCIMENTO	NÍVEIS (mg/L)			MÉDIA
		1	2	4	
Folha a	2,4-D	0,029 c	0,019 b	0,017 c	0,022 b
	AIB	0,088 a	0,070 a	0,059 b	0,072 a
	ANA	0,054 b	0,083 a	0,073 a	0,070 a
Caule b	2,4-D	0,024 a	0,019 b	0,017 b	0,020 b
	AIB	0,034 a	0,062 a	0,038 a	0,045 a
	ANA	0,035 a	0,016 b	0,024 b	0,025 b

Médias seguidas por letras minúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para os calos formados dos segmentos caulinares, o melhor resultado também foi com AIB, porém, com 2,0mg/L obtendo-se 0,062g (Figura 17).

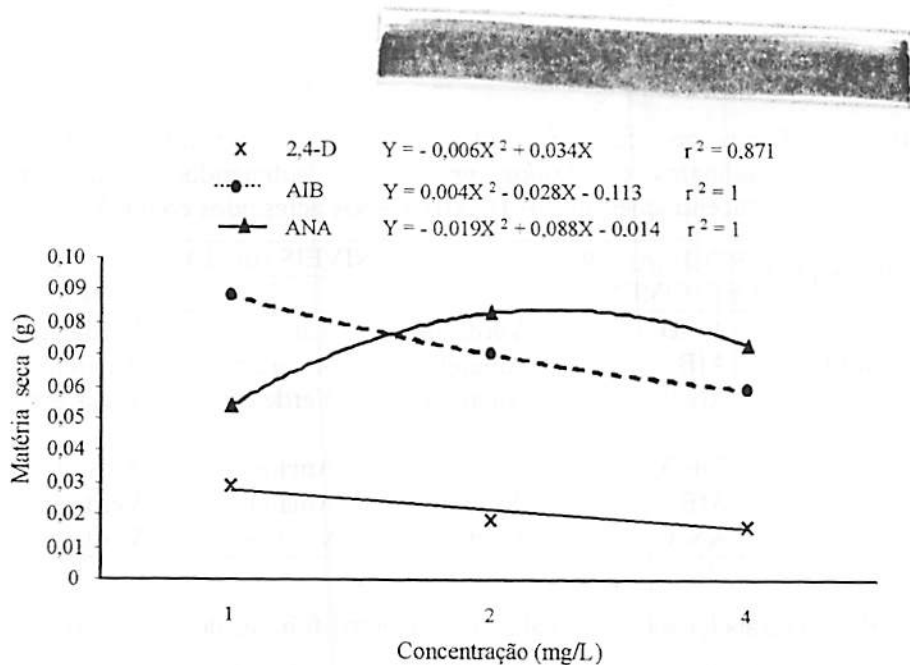


FIGURA 17. Peso da matéria seca dos calos formados a partir de segmentos caulinares de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, AIB e ANA acrescidos com BAP. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Os tratamentos utilizados formaram calos friáveis, porém, o tratamento com o regulador AIB formou calos de consistência um pouco compacta. Notou-se também que, à medida em que foi aumentada a concentração de 2,4-D, alguns calos mostraram início de necrose, sugerindo toxidez. Calos friáveis são mais favoráveis ao uso em suspensão celular.

Com relação às cores dos calos formados, notou-se que, tanto os segmentos foliares como caulinares produziram calos de mesma cor. Quando foram utilizados AIB e ANA, os calos exibiram as cores amarela e verde escura, respectivamente, para ambos os tipos de segmentos e, com o uso do 2,4-D em segmentos caulinares, ocorreu a produção de calos de cor verde escura, enquanto que, a partir de segmentos foliares, os calos tinham cor amarelo. Podemos observar que houve uma tendência para produção de calos de coloração verde escura nos tratamentos com maiores concentrações, utilizadas como mostra na Tabela 11.



TABELA 11. Cores dos calos formados a partir de segmentos foliares e caulinares de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de 2,4- D, AIB e ANA acrescidos com BAP.

EXPLANTE	REGULADOR CRESCIMENTO	NIVEIS (mg/L)		
		1	2	4
Caula (a)	2,4-D	Verde esc.	Verde esc.	Verde esc.
	AIB	Amarelo	Amarelo	Amarelo
	ANA	Amarelo	Verde esc.	Verde esc.
Folha (a)	2,4-D	Verde esc.	Amarelo	Amarelo
	AIB	Amarelo	Amarelo	Verde esc.
	ANA	Verde esc.	Verde esc.	Verde esc.

Para o estabelecimento de calos, e segmentos foliares de *Cleome viscosa* (Caparidaceae), uma espécie medicinal, foram cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento obtendo melhores resultados com 10,74 μ M de ANA e 8,87 μ M de BA, quando os calos tiveram a cor verde e consistência compacta. O maior nível de auxina favoreceu subsequente organogênese com diferenciação de brotos (Naseem e Jha ,1994).

3.6.2 Diferenças na indução de calos em fontes de explantes obtidas in vitro e in vivo.

No experimento anterior, melhores resultados foram obtidos com explantes foliares provenientes do cultivo in vitro e ambiente de luminosidade tendo 100% de área formada com calos no tratamento com ANA+BAP, ambos na concentração de 2,0mg/L. Então, para se determinar a melhor fonte de explante cultivados in vivo ou in vitro e o ambiente favorável de luz ou escuro para o desenvolvimento para a formação dos calos optou-se por fazer este experimento.

De acordo com a Figura 18, pode-se observar que houve formação de 100% de calos em todos os tratamentos, com exceção dos explantes provenientes do cultivo in vitro e acondicionados em ambiente de luz, que tiveram apenas 75% de formação de calos, diferindo dos dados do experimento anterior (Figura 12) no qual os segmentos foliares oriundos de plântulas estabelecidas in vitro atingiram 100% de área coberta com calos.

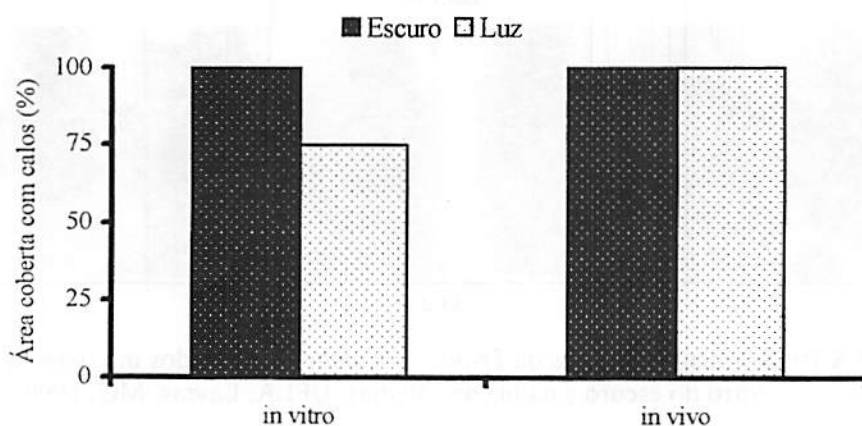


FIGURA 18. Área coberta com calos (%) formados a partir de explantes cultivados in vitro e in vivo na luz e escuro em *Tridax procumbens* aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Tanto os calos provenientes do cultivo in vivo como in vitro tiveram como cor predominante o verde, quando expostos à luz o que sugere um processo de biossíntese de clorofila e formação de cloroplastos, porém, quando os mesmos foram cultivados no escuro exibiram coloração predominante branco-amarelado. A maioria dos calos provenientes do cultivo in vitro apresentavam consistência friável e os do cultivo in vivo apresentaram-se um pouco consistente (Figura 19).

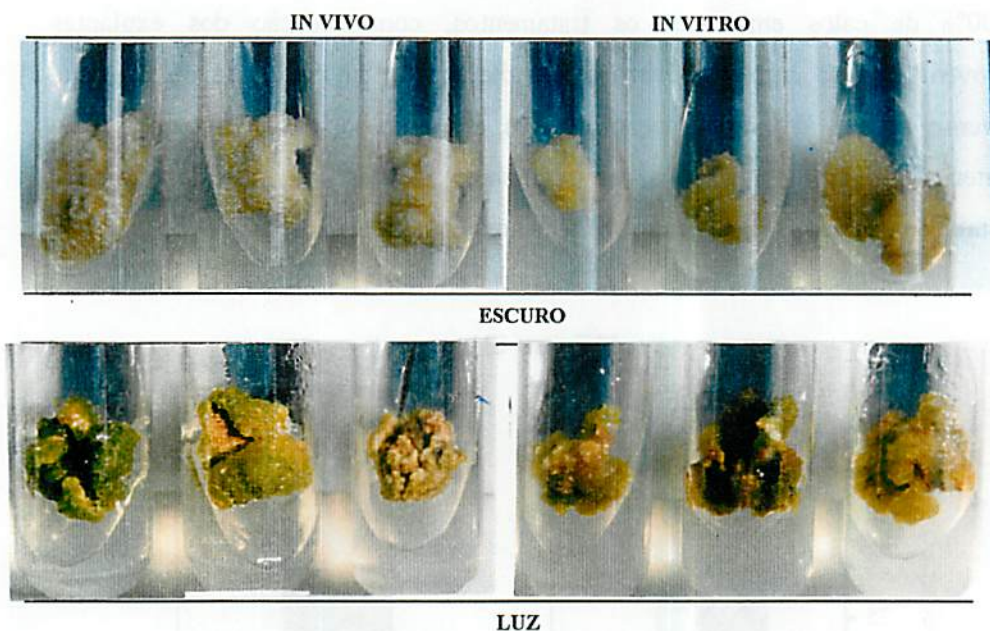


FIGURA 19. Segmentos foliares de *Tridax procumbens* cultivados in vivo e in vitro no escuro e na luz aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 1999.

Vários fatores podem influenciar na coloração e consistência dos calos. Declerck e Korbam (1996) estudando a influência de reguladores de crescimento e diferentes fontes de carbono em segmentos foliares de *Prunus persica* L. Batsch (Rosáceas) cv. Elberta Queen, quando cultivados em meio MS com 50% da concentração dos seus sais, constataram que a presença de TDZ produziu calos verdes e de consistência compacta e com 2,4-D os calos foram amarelos e de consistência friável. Foi observada uma maior frequência de calos verdes e compactos na presença de glucose quando comparados com a formação de calos na presença de frutose e sacarose ao meio de cultivo.

Para a variável peso da matéria fresca de calos, os tratamentos utilizados tiveram média de 1,351g para explantes provenientes do cultivo in vitro e de 1,05g para in vivo quando foram acondicionados na luz e 0,933g para os calos

provenientes do cultivo in vitro e 1,533g para in vivo, quando foram acondicionados no escuro (Tabela 12).

TABELA 12. Peso de matéria fresca (g) de calos formados a partir de explantes cultivados in vitro e in vivo na luz e escuro de *Tridax procumbens* aos 30 dias.

CULTIVO	AMBIENTE		MÉDIA
	Luz	Escuro	
In vitro	1,351 a A	0,933 b B	1,142 A
In vivo	1,05 b B	1,533 a A	1,291 A
Média	1,2 a	1,233 a	1,217

Letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Já, para o peso da matéria seca, podemos observar, na Tabela 13, que os calos tiveram médias iguais de 0,086g, independentemente da fonte originada, ou seja, in vitro e in vivo quando foram mantidos em ambiente de luz. Porém os que foram mantidos no escuro originados do cultivo “in vivo” obteve valor superior (0,075g) em relação aos calos originados do cultivo “in vitro” que foi de 0,050g.

TABELA 13. Peso de matéria seca (g) de calos formados a partir de explantes cultivados “in vitro” e “in vivo” na luz e escuro de *Tridax procumbens* aos 30 dias.

CULTIVO	AMBIENTE		MÉDIA
	Luz	Escuro	
In vitro	0,086 a A	0,050 a A	0,068 A
In vivo	0,086 a A	0,075 a A	0,086 A
MÉDIA	0,086 a	0,063 b	0,074

Letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.6.3 Estabelecimento da curva de crescimento de calos em *Tridax procumbens*

De acordo com as Figuras 20 e 21, pode-se observar que as curvas de crescimento celular de calos em *Tridax procumbens* apresentaram as cinco fases distintas: lag, log ou exponencial, linear, desaceleração e estacionária.

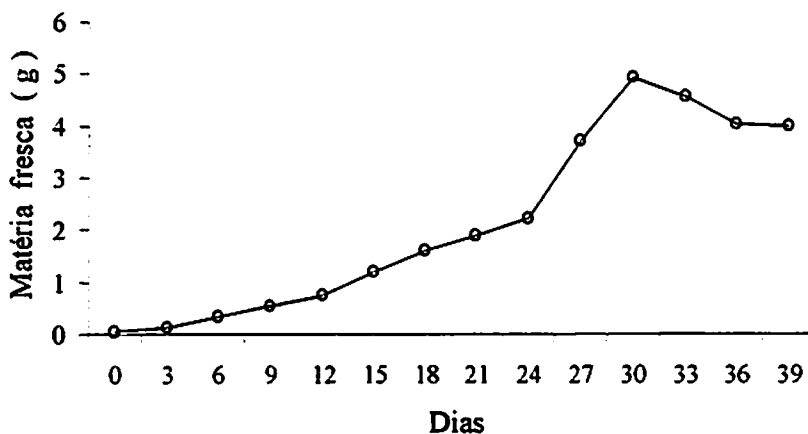


FIGURA 20. Curva de crescimento de matéria fresca (g) de calos formados a partir de segmentos foliares de *Tridax procumbens*, durante 39 dias na ausência de luz. UFLA, Lavras, MG, 1999.

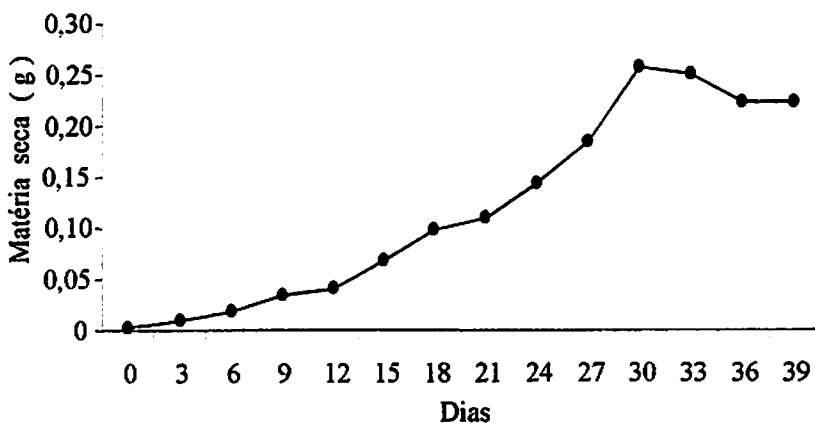


FIGURA 21. Curva de crescimento de matéria seca (g) de calos formados a partir de segmentos foliares de *Tridax procumbens*, durante 39 dias na ausência de luz. UFLA, Lavras, MG, 1999.

A fase lag, na qual as células preparam-se para a divisão, ocorreu até o nono dia. O período de máxima divisão celular ocorre na fase exponencial. A fase lag é considerada como uma fase produtora de energia e a exponencial como a fase biossintética (Shimuzu et al., 1977). O período de crescimento ou fase linear é aquela na qual as células crescem, porém a divisão celular diminui, conforme reporta Lameira (1997). Tanto a fase exponencial quanto a fase linear ocorreram entre o nono e o trigésimo terceiro dia. Nesta espécie, as fases exponencial e linear foram mais longas quando comparadas com a curva de crescimento em *Cordia verbenacea* L. (Boraginaceae), onde ocorreram entre o sexto e vigésimo dia (Lameira, 1997) e em *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae), registradas entre o sexto e o vigésimo quarto dia (Abreu, 1998).

O período de desaceleração do crescimento e a fase estacionária dos calos ocorreram entre o trigésimo e trigésimo nono dia. A fase de desaceleração é o período em que deve-se fazer a transferência do cultivo para um novo meio nutritivo devido a exaustão dos nutrientes, presença de produtos tóxicos, secagem do ágar e a redução de O₂ no interior das células e calos conforme Smith, (1992).

A fase estacionária é o período onde o número de células se mantém constante, e em que, geralmente, ocorre o maior acúmulo de metabólitos secundários. Porém, este acúmulo pode ocorrer em fases distintas de crescimento celular, segundo Lameira (1997).

Os nutrientes do meio podem influenciar a passagem de uma fase para outra, acelerando-a ou retardando-a. É importante obter-se a determinação do nutriente limitante, pois, através dele pode-se ter um controle sobre a longevidade da fase estacionária (Aitchison, Macleod e Yeoman, 1977).

O acúmulo de metabólitos secundário, ocorre nas diferentes fases de crescimento celular, podendo ser durante a fase estacionária com uma relação inversa entre crescimento e acúmulo, e acúmulo durante a fase logarítmica,

quando o mesmo está associado com a divisão celular. Este acúmulo apresenta uma correlação aparente entre diferenciação estrutural e produção de metabólitos secundários, podendo, em vários casos, ser devido a um aumento na habilidade de vacuolização das células para acumular estes metabólitos (Aitchison, Macleod e Yeoman, 1977).

Para saber-se em qual fase ocorre o acúmulo de metabólitos secundários nesta espécie é indispensável fazer uma análise das substâncias nas diferentes fases do seu crescimento, determinando, assim, o período para realização da sua repicagem de manutenção.

3.6.4 Diferenças na estrutura celular de fontes de explantes cultivados in vitro e in vivo.

Pela análise histológica das folhas provenientes de plantas da casa de vegetação, ou seja, cultivadas in vivo observa-se (Figura 22B) um mesofilo constituído de um parênquima paliçádico formado de uma camada de células e um parênquima lacunoso mais compacto, apresentando quatro a cinco camadas de células. Na Figura 22A observa-se nervura principal com presença de tricomas secretores em ambas epidermes e dois feixes vasculares de diferentes dimensões.

Diferenças na Estrutura Celular

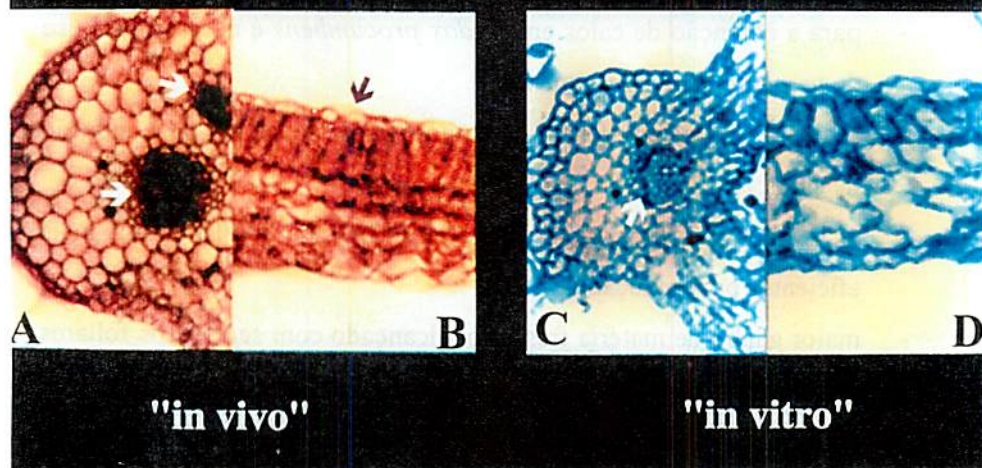


FIGURA 22. Corte histológico de folhas de *Tridax procumbens* cultivada in vivo e in vitro. (Escala: A, C e D = 1/25μm; e B=1/50μm). UFLA, Lavras, MG, 1999.

Em folhas de plantas provenientes do cultivo in vitro, pode-se notar um mesofilo, sem a diferenciação de tecido paliádico e lacunoso (Figura 22D). A Figura 22C, que ilustra a região da nervura principal e do feixe colateral, exhibe a presença de tricomas, porém, em um número bem reduzido em relação as plantas cultivadas in vivo.

Observação similar foi encontrada por Abreu (1998) trabalhando com tecidos de folhas da espécie *Cissus sicyoides*, os quais apresentaram uma formação de células não diferenciadas. Se no tecido houver apenas células não diferenciadas, elas estarão aptas a entrar na divisão celular imediatamente.

3.7 CONCLUSÕES

Nas condições em que os trabalhos foram realizados, conclui-se que:

- para a obtenção de calos em *Tridax procumbens* é necessário o uso de reguladores de crescimento;
- segmento foliar apresentou-se como o mais adequado para indução de calos;
- os reguladores de crescimento ANA+BAP (2,0mg/L) foram mais eficientes para indução de calos;
- maior ganho de matéria fresca foi alcançado com segmentos foliares provenientes do cultivo in vivo e acondicionado no escuro;
- maior ganho de matéria seca foi possibilitado com segmentos foliares e com AIB+BAP na concentração de 1,0 e 2,0mg/L, respectivamente;
- A curva de crescimento celular apresentou as cinco fases distintas num período total de 39 dias de crescimento in vitro.

3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, I.N. de Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides*. Lavras: UFLA, 1998. 113p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- AITHIISON, P.A.; MACLEOD, A.; YEOMAN, M.M. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: STREET, H.E. (ed.) Plant tissue and cell culture. 2.ed. California: Blackwell Scientific Publications, 1977.p.267-306.
- BAOCHENG, Z.; AIMIN, W.; YALI, C. et al. Studies on tissue culture of *Pinellia pedatisecta* schott and analysis of its medicinal composition. *Acta Agronomica Sinica*, Beijing, China, v.21, n.4, p.475-478, 1995.
- BECKER, Propagação vegetativa *in vivo* e *in vitro*, indução de calos, nutrição, extração e quantificação de alcalóides nas espécies *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. (Quebra-pedras). Lavras: UFLA, 1997. 96p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- BUKATSH, F. Benerkungen zur doppelfarbung astrablau-safranina. *Mikrokosmos*, Stuttgart, v. 61, p.255, 1972.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: CBAB/EMBRAPA, 1998. v.1, p.87-132.
- CONSTABEL, J.M.; VASIL, I.K. Cell culture and somatic cell genetics of plants, vol.4. Flórida: Academic Press, 1987. v.4, p. 597-614.
- DOP, P.; GAUTIÉ, A. Manuel de technique. Paris: J. Lamane, 1907. 534p.
- DUSKOVA, J.; DUSEK, J. *Leuzea carthamoides* DC. *in vitro*. *Herba Polonica*, Poland, v.41, n.4, p.165-169, 1995.
- FLICK, C.E.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; Organogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. *Handbook of plant cell culture*. New York: Mac Millan Publishing Company, 1986. cap.2, p.13-67.

- HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese “in vitro”. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.) *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA/CNPH, 1990. p.203-212.
- JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill, 1940. 523p.
- KAJIKI, F.O. Estudo das condições para indução de calos e produção de compostos secundários em *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. Piracicaba: ESALQ, 1996. 96p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas).
- LAMEIRA, O.A. Propagação in vitro e in vivo, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.) Lavras: UFLA, 1997. 87p.(Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- LAMEIRA, O.A.; COSTA, M.P.; PINTO, J.E.B.P. The efficiency of shoot and plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* after three subcultures in vitro. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.24, n.3, p.523-526, set/dez. 1994.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review Plant Physiology*, Washington, v.25, p.135-166, 1974.
- PANIEGO, N.P.; GIULETTI, A.M. *Artemisia annua* L.: dedifferentiated and differentiated cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v.36, n.2, p.163-168, 1994.
- PIERIK, R.L.M. *In Vitro culture of higher plants*. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1989. p.202-220.
- RADY, M.R.; NAZIF, N.M. Response of explant type to proliferation and anthraquinones accumulation in *Cassia acutifolia*. *Fitoterapia*, Roma, v.68, n.4, p.349-354, 1997.
- SASS, J. *Botanical microtechnique*. Iowa: Iowa State College Press, 1951. 228p.
- SMITH, R.M. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. San Diego: Academic Press, 1992. 171p.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis na plant regeneration. In: DIXON, R. A. (ed.) **Plant Cell Culture, a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1985. p.79-105.

UPADHYAY, N.; MAKOVEYCHUK, A.Y.; NIKOLAEVA, L.A. et al. Organogenesis and somatic embryogenesis in leaf callus culture of *Rauwolfia caffra* Sond. **Journal of Plant Physiology, Stuttgart**, v.140, n.2, p.218-222, 1992.

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

ANEXOS

QUADRO 1. Análise de variância de MS em diferentes concentrações (12,5; 25; 50 e 100 %) de segmentos nodais micropropagados de *Tridax procumbens* L., após 40 dias do cultivo inicial.

CAUSA DE VARIÇÃO	G.L.	QUADRADO MÉDIO						
		Altura	Nº brotos	Raiz	PF (Aérea)	PF (Raiz)	PS (Aérea)	PS (Raiz)
CONCENTRAÇÃO	2	53,169**	0,063 ^{NS}	13,135 ^{NS}	0,030**	0,051 ^{NS}	0,00015 ^{NS}	0,00127 ^{NS}
ERRO	12	2,223	0,094	3,263	0,005	0,033	0,000004	0,00023
MÉDIA		8,265	1,813	6,688	0,396	0,114	0,034	0,017
CV (%)		18,04	16,89	27,01	17,053	159,08	19,50	89,98

** significativo pelo teste ($p > 0,01$)

^{NS} não significativo

QUADRO 2. Análise de variância de BAP em diferentes concentrações (0; 0,5 e 1mg/L) + 100% de MS a partir de segmentos nodais de *Tridax procumbens* L., após 30 dias de cultivo inicial.

CAUSA DE VARIÇÃO	G.L.	QUADRADO MÉDIO						
		Altura	Nº brotos	Raiz	PF (Aérea)	PF (Raiz)	Ps (Aérea)	PS (Raiz)
CONCENTRAÇÃO	2	23,538**	0,110 ^{NS}	2,945 ^{NS}	0,010 ^{NS}	0,006 ^{NS}	0,0003 ^{NS}	0,00001 ^{NS}
ERRO	12	0,525	0,343	1,806	0,028	0,005	0,00061	0,00003
MÉDIA		3,275	2,203	3,413	0,418	0,108	0,039	0,008
CV (%)		22,13	26,57	39,37	40,30	66,32	63,73	71,98

** significativo pelo teste ($p > 0,01$)

^{NS} não significativo

QUADRO 3. Análise de variância de BAP x TDZ em diferentes concentrações (0,125; 0,25; 0,5 e 1mg/L) de plântulas a partir de segmentos nodais de *Tridax procumbens* L.

CAUSA DE VARIÇÃO	G.L.	QUADRADO MÉDIO				
		Altura	Nº brotos	Raiz	PF (Aérea)	PS (Aérea)
Testemunha x regulador de crescimento	1	20,188**	5,751**	6,467ns	0,123**	0,0008**
Regulador de crescimento	1	9,432**	28,90**	98,439**	0,143**	0,00097**
Concentração	3	6,181**	2,402**	20,643**	0,009ns	0,00001ns
R x C	3	4,848ns	3,829**	1,822ns	0,047ns	0,00021ns
Erro	36	0,452	0,483	2,615	0,0138	0,00007
Média		1,194	1,761	3,378	0,268	0,021
CV (%)		56,33	39,48	47,87	43,83	39,30

** significativo pelo teste ($p > 0,01$)

^{NS} não significativo

QUADRO 4. Análise de variância para matéria fresca (g) e matéria seca (g) a partir de explantes cultivados in vitro e in vivo na ausência e não de luz de *Tridax procumbens* L., aos 30 dias.

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	QUADRADO MÉDIO	
		MATÉRIA FRESCA	MATÉRIA SECA
CULTIVO	1	0,1114 ^{NS}	0,0008 ^{NS}
AMBIENTE	1	0,0053 ^{NS}	0,0027 ^{**}
CULTIVO X AMBIENTE	1	1,0156 ^{**}	0,0008 ^{NS}
ERRO	16	0,0832	0,0002
MÉDIA		1,217	0,0743
CV (%)		23,71	19,00

^{**} significativo pelo teste F (p < 0.01)

^{NS} não significativo

QUADRO 5. Análise de variância de regulador de crescimento (2,4-D, AIB e ANA) em diferentes concentrações (1, 2 e 4 mg/L) e explantes (Caule e Folha)

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	QUADRADO MÉDIO	
		P F (Raiz)	P S (Raiz)
Test. x regulador de crescimento	1	0,1529 ^{**}	0,0004 ^{**}
Testemunha x explante	1	0,9360 ^{**}	0,0040 ^{**}
Regulador de crescimento	2	1,9520 ^{**}	0,0110 ^{**}
Concentração	2	0,0370 ^{NS}	0,0005 ^{**}
Explante	1	3,4940 ^{**}	0,0090 ^{**}
R. crescimento x concentração	4	0,1710 ^{**}	0,0003 ^{**}
R. crescimento x explante	2	0,4030 ^{**}	0,0020 ^{**}
Concentração x explante	2	0,1740 ^{NS}	0,0005 ^{NS}
R. cresc. x conc. x explante	4	0,9020 ^{**}	0,0030 ^{**}
Erro	80	0,0150	0,0001
Média		0,516	0,042
CV (%)		23,77	20,07

^{**} significativo pelo teste F (p < 0.01)

^{NS} não significativo

