

Cultura de Tecidos de *Cecropia glaziovii* Sneth. (Moraceae):

Micropropagação Vegetativa e Regeneração por Organogênese.

Marcos Nopper Alves 87

Orientador: Prof. Dr. Rolf Dieter Illg +

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas na área de Biologia Vegetal

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS - 1993

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Marcos Nopper Alves
Rolf Dieter Illg (Orientador)
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dedico este trabalho ao meu pai,
Rubem, pelo estímulo que me
foi sempre dado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Rolf Dieter Illg, pela ajuda e amizade;

À Universidade de Campinas, por oferecer todas as condições de realizar este trabalho;

Ao Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, pela minha orientação em iniciação científica;

Ao Dr. Sérgio F. Paschollati e à Dr. Walkíria B. C. de Moraes, que me iniciaram na carreira profissional;

À FAPESP, pela concessão de auxílio a pesquisa para realização deste trabalho;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	viii
Resumo	ix
Summary	xi
1. Introdução	1
2. Objetivos	6
3. Revisão Bibliográfica	7
3.1. Cultura de Tecidos	9
3.2. Propagação Clonal	10
3.3. Cultura de Tecidos de Plantas Medicinais	12
3.4. Micropropagação de Plantas Medicinais	15
3.5. Embriogênese Somática em Plantas Perenes	16
3.6. Controle "in vitro" da Morfogênese em Plantas Arbóreas	20
3.7. Formação de Raízes em Arbóreas	22
3.8. Origem, Distribuição Natural e Taxonomia de <i>Cecropia</i>	26
3.9. Propriedades Terapêuticas	28
4. Materiais e Métodos	30
4.1. Cultivo de Plantas Doadoras de Explantes	30
4.2. Obtenção de Culturas Assépticas a Partir de Sementes	31
4.3. Obtenção de Explantes Esterilizados a Partir de Plantas do Campo	32
4.4. Estabelecimento de Cultura de Ápices e Micropropagação	34
4.5. Indução de Calos	35
4.6. Regeneração de Plantas a Partir de Calos	37

4.7. Enraizamento	38
4.8. Aclimatação	38
4.9. Testes Estatísticos	39
5. Resultados e Discussão	40
5.1. Cultivo de Plantas	40
5.2. Obtenção de Plantas Esterilizadas a Partir de Sementes	40
5.3. Obtenção de Culturas Esterilizadas a Partir de Plantas do Campo	41
5.4. Cultura de Ápices Caulinares	44
5.5. Indução de Calos	46
5.6. Regeneração de Plantas a Partir de Calos	56
5.7. Enraizamento	62
5.8. Aclimatação	65
6. Conclusões	69
7. Literatura Citada	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	71
Figura 2	72
Figura 3	73
Figura 4	73
Figura 5	74
Figura 6	75
Figura 7	76
Figura 8	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	37
Tabela 2	42
Tabela 3	45
Tabela 4	47
Tabela 5	48
Tabela 6	50
Tabela 7	51
Tabela 8	53
Tabela 9	54
Tabela 10	55
Tabela 11	58
Tabela 12	60, 61
Tabela 13	63
Tabela 14	66
Tabela 15	68

ANEXOS

Quadro 1.....	100
Quadro 2.....	100
Quadro 3.....	101
Quadro 4.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	-	Ácido abcísico
BAP	-	6 Benzilamino Purina
2,4-D	-	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
2iP	-	N-Isopentenil Aminopurina
GA	-	Ácido Giberélico
IAA	-	Ácido Indol Acético
IBA	-	Ácido Indol Butírico
KIN	-	Cinetina
M.S.	-	Murashige & Skoog (1962)
NAA	-	Ácido Naftaleno Acético
TDZ	-	Thidiazuron (N-phenil-N'-1,2,3-thidiazol-5 urea)
ZEA	-	Zeatina

RESUMO

A flora tropical sul-americana é rica em espécies produtoras de farmacos. *Cecropia glaziovii* é uma das espécies tropicais indicadas pela Central de Medicamentos como possuidora de atividade farmacológica comprovada no tratamento da bronquite, tosse, coqueluche e cancro. O único princípio ativo até hoje identificado nesta espécie, a isovitexina, é indicado também como diurético e tônico cardíaco. Esta espécie alógama, possui na sua população natural uma variação morfológica que se reflete diretamente na sua biomassa, como também na variação em concentrações de princípios ativos presentes nas suas folhas e estípulas. Uma fonte de dificuldades no uso de plantas diretamente a partir de populações naturais é a variação genética, fisiológica e química, que leva eventualmente a atividades biológicas muito variáveis ou, em casos extremos até opostas. Medidas que visem a obtenção de clones que possuam altos teores de princípios ativos seriam de grande valia para estudos químicos e farmacológicos desta espécie.

O presente trabalho objetivou o desenvolvimento de metodologia de cultura "in vitro" dessa espécie arbórea visando a sua multiplicação em larga escala. A finalidade por um lado é de obter metodologia adequada para clonagem de plantas possuidoras de princípios ativos em quantidades elevadas através de micropropagação; por outro lado, objetivamos a regeneração de plantas com possível variabilidade morfológica de interesse agronômico e químico.

Todos os ensaios foram conduzidos em condições controladas de luz e temperatura. Visando a multiplicação vegetativa, brotos apicais, axilares e submeristemas previamente esterilizados foram inoculados em meios de cultura compostos por sais de Murashige & Skoog (1962) suplementado com diferentes concentrações dos fitoreguladores BAP, 2iP, KIN, ZEA e IAA.

Folhas, estímulas e pecíolos previamente esterilizados foram testados para a indução de calos em meio básico de M.S. suplementado com diferentes concentrações de BAP, 2iP, KIN, 2,4-D e IAA. Tentativas de regeneração de plântulas *via* organogênese ou embriogênese foram realizadas a partir de meios de M.S. suplementado com diferentes concentrações de BAP, 2,4-D, IAA, 2iP e ZEA inoculados com calos compactos e friáveis.

Os resultados demonstraram que as combinações BAP 10,0 mg/l + NAA 2,0 mg/l e BAP 10,0 + IAA 1,0 mg/l e apenas BAP 10,0 mg/l levaram a uma maior proliferação vegetativa de brotos. Calos foram obtidos com maior frequência quando meios de M.S. suplementado com 2,4-D 5,0 mg/l + BAP 1,0 mg/l, foram inoculados com pecíolos e incubados na ausência de luz à temperatura de 25° C. Plântulas foram regeneradas a partir de calos por organogênese quando estes foram mantidos em meio M.S. suplementado com 2,4-D 10,0 mg/l ou 2,4-D 1,0 mg/l + ZEA 0,1 mg/l por 30 dias. As plantas regeneradas foram posteriormente propagadas vegetativamente utilizando os melhores meios de propagação vegetativa já descritos acima. O enraizamento foi obtido transferindo-se brotos para meio M.S. acrescido de IAA 1,0 mg/l. As plantas foram aclimatadas durante 30 dias em substrato de vermiculita, sob alta umidade relativa (90 a 100 %) acrescida de solução nutritiva de Hoagland a cada 2 dias.

Alta taxa de multiplicação de *C. glaziovii* foi obtida através de micropropagação sem a necessidade de se induzir a juvenilidade nas plantas adultas. Plantas de *C. glaziovii* foram regeneradas por organogênese e não foi observada regeneração *via* embriogênese somática. Foi obtida alta frequência de regeneração de plantas de *C. glaziovii* fato não muito comum em espécies arbóreas.

SUMMARY

The South American tropical flora is rich in plants with therapeutical properties. *Cecropia glaziovii* Sneth., has been indicated by the "Central of Medicamentos" as one of the tropical plant species with attested pharmacological properties in the treatment of bronchitis, cough and cancer. The only active component thus far identified in this species, the isovitexin, is also known as diuretic and cardiogenic. This allogamous species presents a morphological variation in its natural population, which reflects not only in its biomass but also in the variation of the active component concentration, present in the leaves and stipulate. As genetic, physiologic and chemical variation are usual difficulties many times encountered in medicinal plant research, one may observe that the biological activities of these plants are not always reproducible. Consequently, clones of plants that have high degrees of active principles would be of high value on chemical and pharmacological studies of this species.

The objective of the present work was to develop a methodology of "in vitro" culture of *C. glaziovii* with the aim of its large scale multiplication. The work was conducted so as to develop a methodology of direct vegetative micropropagation. In addition, methods of plant regeneration *via* calli were developed to investigate a possible regeneration of plants with morphological variability for agronomical and chemical interests.

All experiments were conducted at controlled light and temperature conditions. In order to achieve vegetative multiplication, culture media of Murashige & Skoog salts were inoculated with pre-sterilized shoots and submeristems. The media were supplemented with different concentrations of the growth regulators BAP, 2iP, KIN, ZEA and IAA.

Calli induction was done *via* the inoculation of M.S. basic medium supplemented with different concentrations of BAP, 2iP, KIN, 2,4-D and IAA, with pre-sterilized leaves, stipulate and petioles. Attempts were made to regenerate plantlets *via* organogenesis and embryogenesis by inoculating M.S. media supplemented with different concentrations of BAP, 2,4-D, IAA, 2iP and ZEA with compact and freeable calli.

The results showed that 10.0 mg/l BAP + 2.0 mg/l NAA and 10.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l IAA combinations and 10.0 mg/l BAP alone led to the highest shoot vegetative proliferation. The most effective treatments in calli induction were those in which M.S. salts supplemented with 5.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BAP were inoculated with petioles and incubated in darkness. Plantlets were regenerated through organogenesis by keeping the calli in M.S. media supplemented with 10.0 mg/l 2,4-D or 1.0 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l ZEA during 30 days. These plantlets were subsequently propagated by means of the most effective combinations of the above mentioned growth regulators. Rooting was attained by transferring shoots to the M.S. media supplemented with 1.0 mg/l IAA. The plants were acclimatized in vermiculte substrate for 30 days under high umidity (90 to 100 %). Hoagland nutritive solution was added to the substrate every 2 days.

In conclusion a high rate of *C. glaziovii* multiplication could be reached through micropropagation in mature plants without juvenility induction. Regeneration of *C. glaziovii* was obtained *via* organogenesis. On the other hand, regeneration *via* somatic embryogenesis was not observed. The "in vitro" propagation of *C. glaziovii* was successfully achieved

1. INTRODUÇÃO

A CEME (Central de medicamentos) através do projeto "Plantas Medicinais Brasileiras" elaborado em 1983 indicou o gênero *Cecropia*, particularmente a *Cecropia glaziovii*, dentre uma lista de 6 espécies de plantas de atividade farmacológica comprovada. Entretanto, pouco se conhece a respeito desta espécie de ampla distribuição no território brasileiro.

A espécie *C. glaziovii*, vulgarmente chamada de Umbaúba, Embaúba, Imbaúba, Embaíba ou ainda árvore da preguiça, vêm sendo alvo de estudos farmacológicos em algumas instituições de pesquisa nacionais como a Universidade Federal de Santa Catarina, a Escola Paulista de Medicina e a Universidade Federal do Rio de Janeiro. Estes estudos vêm sendo realizados devido às indicações populares do uso desta planta na cura de diversas doenças como a bronquite, tosses, coqueluche (Cruz, 1965), cancro (Saules, 1948) e no seu uso como diurético e tônico cardíaco (Fonseca, 1935). A sua importância avança além do uso medicinal, uma vez que tem sido sugerido o seu uso na carpintaria, fabricação de papel, pólvora e detergentes (Matta, 1913; Fonseca, 1935, 1940; Saules, 1948; Silva, 1951; Cruz, 1965; Loureiro, 1968). Relatos antigos descrevem o uso de seus troncos sem os septos como condutores de água e suas cinzas como dentifrício, alvejante de roupas, na fabricação de sabão e purificação do caldo de cana-de-açúcar.

•

A carência de trabalhos científicos que visem o conhecimento das propriedades biológicas e químicas de plantas medicinais no Brasil é muito grande e não justificável, uma vez que o Brasil importa mais de 95% dos medicamentos utilizados terapeuticamente. Isto acarretou para o nosso país, um gasto de mais de 400 milhões de dólares o que nos deixa mais dependentes economicamente das grandes potências e dificultando a promoção de melhores condições de saúde coletiva (Carlini, 1988).

O Brasil tem condições adequadas para o desenvolvimento da pesquisa de plantas medicinais. Possui imenso potencial de recursos naturais, incluindo uma vasta flora estimada em 120.000 espécies, extenso território com grande variedade de condições climáticas, propiciando a proliferação abundante dos vegetais e tradição no uso de plantas medicinais. A miscigenação no Brasil reuniu um conhecimento específico sobre a utilização destas plantas, incluindo-as na medicina popular. Assim, o saber popular selecionou mais de 2.000 espécies de plantas medicinais, poucas já estudadas cientificamente. Pelo menos 400 destas plantas são comercializadas por pequenas empresas brasileiras, ainda sem o adequado controle de qualidade por parte destas ou do Governo. Deve-se salientar também que há no país interesse por parte das instituições governamentais, como por exemplo a CEME, de investigar e substituir por plantas, os farmacos importados utilizados no tratamento de doenças como hipertensão, asma, inflamações de úlceras, entre outras.

Calli induction was done *via* the inoculation of M.S. basic medium supplemented with different concentrations of BAP, 2iP, KIN, 2,4-D and IAA, with pre-sterilized leaves, stipulate and petioles. Attempts were made to regenerate plantlets *via* organogenesis and embryogenesis by inoculating M.S. media supplemented with different concentrations of BAP, 2,4-D, IAA, 2iP and ZEA with compact and freeable calli.

The results showed that 10.0 mg/l BAP + 2.0 mg/l NAA and 10.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l IAA combinations and 10.0 mg/l BAP alone led to the highest shoot vegetative proliferation. The most effective treatments in calli induction were those in which M.S. salts supplemented with 5.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BAP were inoculated with petioles and incubated in darkness. Plantlets were regenerated through organogenesis by keeping the calli in M.S. media supplemented with 10.0 mg/l 2,4-D or 1.0 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l ZEA during 30 days. These plantlets were subsequently propagated by means of the most effective combinations of the above mentioned growth regulators. Rooting was attained by transferring shoots to the M.S. media supplemented with 1.0 mg/l IAA. The plants were acclimatized in vermiculte substrate for 30 days under high umidity (90 to 100 %). Hoagland nutritive solution was added to the substrate every 2 days.

In conclusion a high rate of *C. glaziovii* multiplication could be reached through micropropagation in mature plants without juvenility induction. Regeneration of *C. glaziovii* was obtained *via* organogenesis. On the other hand, regeneration *via* somatic embryogenesis was not observed. The "in vitro" propagation of *C. glaziovii* was successfully achieved

1. INTRODUÇÃO

A CEME (Central de medicamentos) através do projeto "Plantas Medicinais Brasileiras" elaborado em 1983 indicou o gênero *Cecropia*, particularmente a *Cecropia glaziovii*, dentre uma lista de 6 espécies de plantas de atividade farmacológica comprovada. Entretanto, pouco se conhece a respeito desta espécie de ampla distribuição no território brasileiro.

A espécie *C. glaziovii*, vulgarmente chamada de Umbaúba, Embaúba, Imbaúba, Embaíba ou ainda árvore da preguiça, vêm sendo alvo de estudos farmacológicos em algumas instituições de pesquisa nacionais como a Universidade Federal de Santa Catarina, a Escola Paulista de Medicina e a Universidade Federal do Rio de Janeiro. Estes estudos vêm sendo realizados devido às indicações populares do uso desta planta na cura de diversas doenças como a bronquite, tosses, coqueluche (Cruz, 1965), cancro (Saules, 1948) e no seu uso como diurético e tônico cardíaco (Fonseca, 1935). A sua importância avança além do uso medicinal, uma vez que tem sido sugerido o seu uso na carpintaria, fabricação de papel, pólvora e detergentes (Matta, 1913; Fonseca, 1935, 1940; Saules, 1948; Silva, 1951; Cruz, 1965; Loureiro, 1968). Relatos antigos descrevem o uso de seus troncos sem os septos como condutores de água e suas cinzas como dentifrício, alvejante de roupas, na fabricação de sabão e purificação do caldo de cana-de-açúcar.

•

A carência de trabalhos científicos que visem o conhecimento das propriedades biológicas e químicas de plantas medicinais no Brasil é muito grande e não justificável, uma vez que o Brasil importa mais de 95% dos medicamentos utilizados terapeuticamente. Isto acarretou para o nosso país, um gasto de mais de 400 milhões de dólares o que nos deixa mais dependentes economicamente das grandes potências e dificultando a promoção de melhores condições de saúde coletiva (Carlini, 1988).

O Brasil tem condições adequadas para o desenvolvimento da pesquisa de plantas medicinais. Possui imenso potencial de recursos naturais, incluindo uma vasta flora estimada em 120.000 espécies, extenso território com grande variedade de condições climáticas, propiciando a proliferação abundante dos vegetais e tradição no uso de plantas medicinais. A miscigenação no Brasil reuniu um conhecimento específico sobre a utilização destas plantas, incluindo-as na medicina popular. Assim, o saber popular selecionou mais de 2.000 espécies de plantas medicinais, poucas já estudadas cientificamente. Pelo menos 400 destas plantas são comercializadas por pequenas empresas brasileiras, ainda sem o adequado controle de qualidade por parte destas ou do Governo. Deve-se salientar também que há no país interesse por parte das instituições governamentais, como por exemplo a CEME, de investigar e substituir por plantas, os farmacos importados utilizados no tratamento de doenças como hipertensão, asma, inflamações de úlceras, entre outras.

Uma fonte de dificuldades no uso de plantas diretamente a partir de populações naturais é a variação genética, fisiológica e química, que leva eventualmente a atividades biológicas muito variáveis ou, em casos extremos até opostas. A seleção dessas plantas, almejada tanto por aqueles que a comercializam quanto pelo usuário, depende de um controle genético e metabólico rigoroso. Isto vêm sendo comprovado como quase impossível devido a fatores imponderáveis dentro das variações constatadas nas atividades farmacológicas dos princípios ativos. Os princípios químicos responsáveis pelas atividades farmacológicas não são conhecidos e os mecanismos que levam a esta variação não foram estudados, o que tipicamente se expressa na perda parcial ou total de atividade em plantas cultivadas fora do seu ambiente natural.

Os fatores que levariam à síntese ou acúmulo de metabólitos secundários de atividade biológica nas plantas incluem os físicos como solo, clima (temperatura, umidade, ventos e sua variação anual) e luz; os químicos, especialmente certos elementos na faixa de disponibilidade de rizosfera, poluentes e aditivos; os genéticos que refletem respostas e adaptações a ambientes no passado através de reprodução diferencial de diversos genótipos; os fisiológicos, inclusive ritmos circadianos e estacionais (fases de crescimento e fluxo de hormônios), e os bióticos (competição, parasitismo, mutualismo e predação). No caso de plantas medicinais cultivadas, a manutenção e otimização destes fatores para promover uma produção máxima de atividade biológica, requer respeito a todos eles, especialmnete aos bióticos.

Torna-se crítico, portanto, o desenvolvimento de estudos e processos que permitam adaptar espécies de interesse às condições de cultivo, propagar genótipos de elite, praticar o melhoramento genético no sentido de obter plantas com altos teores de princípios ativos e desenvolver processos biotecnológicos com a finalidade de obter fontes alternativas para produção de importantes produtos naturais de plantas.

A cultura de tecidos vegetais tem sido amplamente utilizada para atender várias desses objetivos e foi aqui utilizada com a finalidade de propagar plantas de *C. glaziovii*. A padronização de uma metodologia que permita a obtenção de clones de plantas com genótipos selecionados facilitaria muito o estudo dos princípios ativos responsáveis pelos seus efeitos farmacológicos. O estabelecimento de uma tecnologia de cultivo racional desta espécie, possibilitará a sua produção em escala comercial sem o risco de ver suas reservas naturais diminuídas ou mesmo extintas, pela exploração extrativa como já aconteceu, por exemplo, com a ipeca, o jaborandi e a espinheira santa.

Resta ressaltar a dificuldade em se propagar através de cultura de tecidos, plantas arbóreas e perenes. Em muitos casos, há necessidade de se utilizar tecidos rejuvenescidos a partir de tecidos maduros para se obter sucesso no processo de cultura "in vitro". Tecidos maduros em muitos casos não possuem respostas morfogênicas diante de tratamentos hormonais. Porém, muitas vezes a utilização destes tecidos jovens ou rejuvenescidos levam a

resultados que não refletem a realidade em tecidos maduros. Características como por exemplo a produção de certos metabólitos secundários no tecido podem não estar presentes em tecidos jovens ou rejuvenescidos, dificultando o estudo da planta adulta. Uma vez viabilizada a técnica de cultura de tecidos para a propagação de *C. glaziovii*, este estudo poderá ajudar na elaboração de protocolos para a propagação de outras arbóreas de interesse comercial.

2. OBJETIVOS

2.1 Micropropagação vegetativa direta a partir de gemas axilares e apicais, visando a multiplicação em larga escala de plantas de *Cecropia glaziovii* Sneth. (Moraceae).

2.2. Indução de calos e regeneração de plantas via embriogênese ou organogênese. A finalidade por um lado é obter clones, e por outro lado, desenvolver metodologia que permita gerar plantas com variabilidade genética (variação somaclonal).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Muitas plantas superiores acumulam substâncias orgânicas possíveis de serem extraídas em quantidades economicamente viáveis, servindo como matéria-prima com várias aplicações tanto científico tecnológicas quanto comerciais. Estas substâncias naturais são empregadas direta ou indiretamente por um grande número de indústrias como fontes produtoras de óleo, resinas, taninos, saponinas, borracha, gomas, cêras, corantes e farmacos, entre outros (Misawa, 1985).

Entre os metabólitos primários são incluídos os óleos, ácidos graxos e carboidratos (sacarose, amido, pectina, celulose). O valor comercial de tais produtos é relativamente baixo oscilando entre US\$ 2,20 a US\$ 4,40 por quilograma estando disponíveis em grandes quantidades no mercado.

Metabólitos secundários são compostos biossinteticamente derivados de metabólitos primários porém com distribuição mais limitada no reino vegetal, sendo restritas a determinados grupos taxonômicos. Compostos secundários não possuem função aparente no metabolismo primário da planta, contudo, frequentemente possuem um papel ecológico. Podem ser atrativos para polinizadores, resultado de adaptações e condições de estresse ambiental, defesas químicas contra microorganismos, insetos ou outros predadores, ou mesmo contra outras plantas (Harborne, 1972; Wallace & Mansel, 1976;

Harborne, 1978; Mann, 1978; Mainwald *et al.*, 1978; Rosenthal & Jansen, 1979; Beel & Charlwood, 1980; Harborne, 1982; Hedin, 1983; Putnam, 1983; Rice, 1984). Metabólitos secundários são frequentemente acumulados em pequenas quantidades nas plantas, em comparação aos metabólitos primários. Além disso, os metabólitos secundários tendem a ser sintetizados em determinados tipos de células especializadas e em determinados estágios de desenvolvimento, o que dificulta sua extração e purificação. Consequentemente, os metabólitos secundários que são usados comercialmente como compostos biologicamente ativos (farmacos, aromas, fragâncias e pesticidas), geralmente tem um alto custo, sendo muitas vezes classificados como química fina, entre os quais situam-se nicotina, piretrinas e rotenona no caso de pesticidas, esteróides e alcalóides no caso de farmacos (Costa, 1964). Os esteróides e alcalóides incluem sapogeninas esteroidais, glicosídeos cardíacos de *Digitalis*, alcalóides antileucêmicos de *Catharanthus*, alcalóides de beladona (como atropina, hiociamina e escopolamina por exemplo), cocaína, colchicina, alcalóides de ópio (codeína, morfina e papaverina), fisostigmina, pilocarpina, quinina, quainidina, reserpina, d-tubocuranina e emetina (Sandberg & Brun, 1972; Fransworth, 1977; Fransworth & Bingel, 1977; Street, 1977; Yeoman *et al.*, 1980) além de outros usados em menor escala. Em contraste com os metabólitos primários o custo dos metabólitos secundários em alguns casos chega a milhares de dólares por quilograma.

Alguns estudos já foram realizados visando o isolamento e

identificação de metabólitos secundários presentes nas folhas de *Cecropia glaziovii*. Nestes, conseguiu-se identificar a presença de atividades farmacologicamente ativas como: relaxamento da musculatura lisa não vascular, ação semelhante aos biobloqueadores adrenérgicos e efeito hipertensor. Em tentativas de se isolar o princípio ou princípios ativos responsáveis por estes efeitos, constatou-se a presença de isovitexin (6-C- β -D-glucopiranosilapigenina), o primeiro metabólito secundário isolado até o momento (Della Monache *et al.*, 1988).

3.1. CULTURA DE TECIDOS

A cultura de tecidos vegetais é uma importante técnica auxiliar em programas de melhoramento de plantas uma vez que possibilita propagar vegetativamente e multiplicar plantas altamente produtivas e com as características desejadas. Espécies de polinização aberta frequentemente produzem sementes com grande variabilidade genética, o que nem sempre é desejável quando se procura reproduzir exemplares altamente produtivos e com alto grau de uniformidade.

Por outro lado a cultura de células vegetais fornece uma valiosa opção para obtenção do aumento de variabilidade genética, relativamente rápida e sem tecnologias sofisticadas. Trata-se da variabilidade gerada pelo uso de um ciclo de cultura de tecidos. Um ciclo de cultura de tecidos envolve o estabelecimento de culturas

de células desdiferenciadas, sob condições definidas de cultivo, proliferação por um determinado número de gerações de células e posterior regeneração de plantas. O maior interesse em se realizar este tipo de cultura, decorre principalmente, desta variabilidade que as plantas frequentemente apresentam após a fase de cultura "in vitro" denominada variação somaclonal (Larkin & Scowcroft, 1981). A variação somaclonal, pode ser explorada com a finalidade de melhoramento genético (Evans *et al.*, 1984).

Finalmente, os avanços na biotecnologia, particularmente dos métodos de cultivo celular de plantas e tecidos, permitem a utilização desses sistemas para produção comercial "in vitro" de substâncias de alto valor comercial e terapêutico. Essas novas tecnologias estão sendo ampliadas, tornando possível a utilização de plantas e células vegetais como fontes renováveis de substâncias químicas valiosas (Illg, 1991).

3.2. PROPAGAÇÃO CLONAL

A utilização mais disseminada da cultura de tecidos é a propagação clonal rápida de plantas com genótipos de elite. A técnica é extremamente útil para a propagação de plantas que se multiplicam lentamente, ou para a obtenção de clones, nos quais se pretende que as plantas produzidas "in vitro" tenham as mesmas características da planta-mãe. Este último pode ser o caso de uma planta com alta

produção de um determinado metabólito secundário. Esta técnica garante uma descendência uniforme que não poderia ser obtida pelo cultivo por sementes em plantas alógamas, devido ao risco de encontrar-se muita variabilidade entre os descendentes.

A propagação clonal rápida foi estabelecida em numerosas espécies de plantas superiores (Murashige, 1978; Vasil & Vasil, 1980) destacando-se espécies ornamentais, frutíferas, hortícolas e medicinais. No caso de plantas medicinais, o objetivo dessa metodologia é o de produzir grande quantidade de clones geneticamente estáveis com relação a determinados princípios ativos.

A técnica de propagação clonal compreende basicamente 3 estágios, segundo Murashige (1974). O estágio I tem como objetivo o estabelecimento da cultura de tecidos da planta desejada. O explante inicial pode ser obtido de quase todas as partes da planta tais como, brotos apicais, axilares, folhas, nós, internós, raízes e compreende a fase de esterilização dos explantes. O estágio II compreende a fase de multiplicação na qual pode ou não haver uma fase intermediária de calo entre o explante e a produção de brotos ou embriões assexuais. Normalmente procura-se evitar a fase de calo uma vez que células do calo tendem a sofrer alterações genéticas e cromossômicas e os brotos daí originados podem ser diferentes da planta original (Larkin & Scowcroft, 1981). No estágio III, as plântulas são preparadas para transferências ao solo. Este estágio envolve o enraizamento dos brotos e aclimação

da planta no sentido de superar a deficiência hídrica, permitindo seu crescimento em condições relativamente desfavoráveis. Frequentemente é possível atingir o estágio I e II sem modificar a composição do meio de cultura ou as condições ambientais. Contudo o enraizamento dos brotos no estágio III e a aclimação das plântulas geralmente requer meios de cultura, condições de luz e temperaturas diferentes. Segundo Harney, 1982, normalmente o enraizamento se dá apenas com a presença de uma auxina no meio de cultura ou na ausência total de fitoreguladores. A aclimação das plantas quase sempre se faz em substratos do tipo vermiculita em ambientes com temperaturas amenas, 20 a 25°C em ambientes com umidade relativa alta, 90 a 100 %. Após períodos de tempo que podem variar de espécie para espécie (20 a 100 dias) as plantas podem ser levadas para o campo ou para viveiros experimentais.

3.3 CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS MEDICINAIS

Conforme definido por Costabel (1990), a biotecnologia é um instrumento pelo qual se pode aumentar a formação e acúmulo de metabólitos desejáveis, modificando se necessário os produtos finais do metabolismo das plantas em questão. Em se tratando de plantas medicinais, a micropropagação, cultura de células, cultura de raízes e manipulação genética são técnicas que possibilitam a melhoria dos farmacos extraídos destas plantas.

O sucesso obtido pela técnica de cultura de células em várias áreas relacionadas com plantas vêm sendo pouco aceita na indústria das

plantas medicinais (Gautheret, 1985). O uso da técnica de cultura de tecidos nesta área se relaciona com poucos exemplos de aplicação prática. Em certos casos os caminhos metabólicos para produção de metabólitos de interesse em calos podem não ser os mesmos encontrados na planta matriz. Em *Ruta graveolus* L., a rutacultina é encontrada em plantas adultas mas não em calos (Kreis & Reinhard, 1989). Em outros casos, porém, a quantidade de compostos medicinais extraídos de calos foi superior ao extraído da planta inteira. Isto se aplica a plantas como *Listhospermum erythrorhizon* Sieb et Zucc., *Copis japonica* Salisb e *Coleus blumei* Benth., *Berberis wilsoniae* Helm.S. et Wils (Kreis & Reinhard, 1989).

A cultura de calos apresenta as seguintes vantagens: 1) ela pode ser conduzida em ambiente controlado reduzindo a influência de fatores ambientais; 2) a produção de metabólitos secundários é bastante superior em tecidos maduros e o tempo necessário para o amadurecimento do tecido de calos é mínimo; 3) a purificação de certos metabólitos a partir de calos é mais simples uma vez que estes não possuem quantidade elevada de pigmentos; 4) a produção de calos é mais facilmente ajustada para suprir a demanda do mercado (Fowler, 1986); 5) a produção de calos está imune a interferências políticas relacionadas à preservação do meio ambiente (DiCosmo & Misawa, 1985; Marques & Brodelius, 1988). Segundo Balandrin & Klocke (1985), no Japão, Alemanha e Canadá, pesquisas vêm sendo realizadas utilizando a técnica de cultura de células de plantas para produzir compostos medicinais de alto valor.

O sucesso da Indústria Petroquímica Mitsui na produção comercial de shikonina por cultura de *Lithospermum erythrorhizon* Sieb et Succ. o lançamento de produtos do tipo batom biológico com grande sucesso em 1984 (Yamada & Hashimoto, 1990) e o grande uso de culturas de *Coleus blumei* Salib., *Coptis japonica* Benth., *Berberis wilsoniae* Helms. et Wils. vêm encorajando a pesquisa e produção de metabólitos secundários pela cultura de tecidos (Fujita, 1988). Segundo Fujita et al. (1985) o custo da tecnologia da cultura de tecidos é alta mas pode ser válida pois em certos casos leva a um aumento significativo da produção de princípios ativos. Estes autores sugeriram que o aumento da produtividade pode ser obtido por três maneiras: (1) seleção de clones que produzem altos teores de compostos; (2) estabelecimento de protocolos de cultura eficientes; (3) adaptação dos protocolos de produção em pequena escala, para bioreatores. Esta produção em bioreatores, ligados a pesquisa na área de biologia molecular relacionada ao metabolismo secundário poderão levar ao uso de calos para a produção de metabólitos de interesse.

Segundo DiCosmo & Misawa (1985) e Eliert et al. (1987) baixos níveis de nutrientes, irradiação com luz ultravioleta e a presença de elicitores específicos como por exemplo carboidratos de levedura, aumentam a atividade enzimática em suspensões celulares de *Talictum rugosum* Ait. Este aumento é acompanhado do aumento da biossíntese de berberina (Marques & Brodelius, 1988). Zenk et al. (1977) introduziram o conceito de usar dois tipos diferentes de meios de cultura para aumentar a produção de compostos fitoquímicos

por cultura de células. O meio de M.S. foi usado para aumentar e manter a cultura de células e um outro meio contendo níveis de nutrientes mais baixos, para aumentar a produção dos compostos fitoquímicos (Linsmaier & Skoog, 1965).

3.4. MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS

O uso de produtos naturais de plantas, como os alcalóides purificados codeína e morfina, é muito dispendioso. O preço destes compostos varia de US\$650 a 1250 por quilograma. Óleos de rosas podem ser avaliados entre US\$2000 a 3000 por quilograma. O alcalóide anticancer de *Catharanthus*, vinblastina e vincristina têm um preço de atacado de US\$20.000 o grama (Balandrin & Klocke, 1985). A micropropagação destas plantas medicinais pode aumentar a sua produção e diminuir o seu preço. O uso de métodos de propagação "in vitro" pode tornar-se um dos processos mais importantes na multiplicação de plantas medicinais. O método pode facilitar a multiplicação de brotos axilares e a preservação de plantas de elite (Costabel, 1990).

Propagação massiva de plantas medicinais também é bastante importante no caso de plantas que produzem poucas sementes, baixa germinação e cuidados especiais para atingirem estágios maduros (Ikeda *et al.*, 1988). Também de grande importância no desenvolvimento de novos produtos de plantas é a preservação do germoplasma (Costabel, 1990). A micropropagação é uma técnica bastante útil na preservação do banco genético, principalmente em

casos de plantas que produzem pouca quantidade de sementes viáveis. Também há uma vasta aplicação da técnicas de micro-propagação de plantas medicinais na propagação clonal e produção de plantas livres de vírus.

3.5. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM ESPÉCIES DE PLANTAS PERENES

Haccius (1978) definiu claramente a embriogênese somática como um processo assexuado de desenvolvimento, no qual é produzido um embrião bipolar a partir de tecido somático. Como discutido por Sharp *et al.* (1984), podem ser distinguidos dois tipos de embriogênese somática: a direta e a indireta. Embriogênese direta se refere ao desenvolvimento de um embrião diretamente a partir do tecido original do explante. A embriogênese somática indireta se refere à formação de embriões a partir de calos ou suspensão celular ou de células ou grumos de células de embriões somáticos. Qualquer célula que possua a capacidade de se diferenciar em um embrião somático é dita como tendo competência embriogênica. Porém, ainda é desconhecido, se estas células são células alvo que respondem a sinais específicos ou se todas as células somáticas possuem esta capacidade. A seleção de explantes em estágios de desenvolvimento específicos, a escolha de meios de cultura específicos, a sequência das subculturas e as condições do meio ambiente são essenciais e necessárias em tentativas de se obter sucesso no processo de embriogênese somática.

O início dos trabalhos de embriogênese somática em plantas lenhosas perenes datam dos trabalhos de LaRue (1954), e de pesquisas com

Biota orientalis Engl. (Konar & Oberoi, 1965) e *Zamia integrifolia* Ait. (Norstog, 1965). Dentre as características que dificultam o estudo da embriogênese em plantas perenes estão: 1) o curto período de tempo em que os tecidos estão viáveis para cultura; 2) o longo período necessário para a regeneração; 3) a frequente produção e liberação de compostos fenólicos levando a reações indesejáveis; 4) o longo período de tempo necessário para o desenvolvimento da pesquisa. Uma vantagem, porém, é o longo período de vida da planta regenerada, permitindo que sejam analisadas todas as características desejadas. O desenvolvimento da pesquisa em embriogênese somática depende primeiramente da natureza da fonte do explante selecionado. Isto se refere às condições nas quais a fonte do explante se desenvolveu e o estágio de desenvolvimento da parte da planta de onde o explante foi retirado. Tecidos jovens normalmente são melhores para o início da indução da embriogênese. Mullins & Scrinivasan (1976) foram os primeiros a reportar trabalhos de embriogênese somática. Eles utilizaram tecido de nucelo de uva referindo-se a este tecido como uma fonte de juvenilidade. Características referentes a tecidos adultos e jovens foram discutidos por Bonga (1981, 1982) e Durzan (1984).

O controle do potencial embriogênico de cada célula na planta é feito pelos processos fisiológicos integrados que ocorrem na planta inteira. Células com potencial embriogênico são separadas das células vizinhas por uma parede celular espessa e as condições de cultivo devem favorecer o desenvolvimento de certas "células induzíveis" e limitar o crescimento de outras. Desta maneira,

podemos ver que os produtos metabólicos produzidos "in vitro" podem estimular a embriogênese e limitar a diferenciação de outras células. Alguns tecidos usados para induzir a embriogênese somática são os cotilédones, óvulo, folha, megagametófito, embriões, hipocótilo, suspensões celulares, anteras, pólen e endosperma (Tisserat & DeMason, 1980) .

Os requisitos nutricionais necessários para indução da embriogênese somática não são bem conhecidos. Eles não são exclusivos nem específicos, uma vez que vários deles podem produzir os mesmos resultados. O meio mais utilizado é o de Murashige & Skoog (1962) na sua composição original ou modificado, mas outros meios já foram utilizados com sucesso em diferentes tecidos (Debruijne *et al.*, 1974). Os meios normalmente utilizados como responsáveis pela indução do potencial embriogênico de algumas células do explante, possuem reguladores de crescimento. Os meios básicos que frequentemente não possuem reguladores de crescimento, proporcionam a expressão do potencial embriogênico. Os hormônios mais comumente utilizados no meio de indução, são o 2,4-D e BAP, e fontes de nitrogênio reduzido como amônio e glutamina. Carboidratos e reguladores osmóticos são usados em outros sistemas tais como suspensões celulares (Kochba & Button, 1974; Buton, 1978; Kochba *et al.*, 1978a, 1978b, 1982). O papel de outros nutrientes na embriogênese somática também foi revisado por Kohlenback (1978).

Trabalhos de Kononowicz & Janick (1984), mostraram que o tipo e quantidade de carboidratos influenciam a embriogênese em tecido

cotiledonar de *Theobroma cacao* (Perne *et al.*, 1981a) Outros estudos mostraram que concentrações elevadas de sacarose aumentam a concentração de antocianinas (Perne *et al.*, 1981b; Radojevic, 1979) e alcalóides (Paiva & Janick, 1983) nos tecidos. Estas substâncias são formadas em embriões zigóticos normais e desta forma indicam maturação de embriões somáticos. Estudos de Ben Hayyim e Newmann (1983) em *Citrus*, mostraram que meio contendo glicerol convertia calos nucelares em embriões somáticos mais eficientemente que meios contendo sacarose. Em outros estudos (Kochba, 1982), a embriogênese somática em *Citrus* foi estimulada de 6 a 12 vezes mais quando galactose e lactose substituíram a sacarose.

Substâncias que estimulam ou inibem o crescimento celular, a diferenciação celular e a expressão dos genes já foram reportadas atuando nos tecidos de embriões somáticos e no seu meio de cultura (Tisserat & Murashige, 1977a, 1977b). Dentre estas substâncias estão o etileno, etanol, GA, auxinas, fenóis, taninos, poliaminas, ABA e dióxido de carbono. Substâncias como ácido dimetil-amino-sucinâmico, etefon, ABA e inibidores da síntese de auxinas (Kochba *et al.*, 1978c) vêm sendo reportados como estimulantes da embriogênese. Outros fatores como baixos níveis de sacarose (Kochba & Button, 1974) e irradiação (Spiegel-Roy & Kochba, 1973) estão relacionados com um aumento na taxa embriogênica. Algumas condições físicas e do ambiente são críticas no processo de embriogênese. Dentre elas, a troca de gases dentro dos frascos, o volume de meio de cultura por explante, qualidade, quantidade e duração da luz, períodos de escuro, frequência de repicagens, seleção dos tecidos

a serem usados (por exemplo: nodular, cor e outros critérios), temperatura, e características do explante são bastante importantes. Por exemplo, em *Coffea* é necessário uma exposição longa da cultura ao escuro para dar início à embriogênese (Sondahl & Sharp, 1979), porém em *Theobroma* a luz se faz necessária (Kong & Rao, 1981).

3.6. CONTROLE "IN VITRO" DA MORFOGÊNESE EM PLANTAS ARBÓREAS

A técnica de cultura de tecidos vem se mostrando um instrumento efetivo na propagação de plantas através de cultura de brotos vegetativos de órgãos de várias espécies de plantas arbóreas jovens como por exemplo *Sequoia sempervirens* (Chapula, 1977; Cheng, 1977; Winton & Verhagen, 1977), *Pinus radiata* (Biondi & Thorpe, 1982), *Pinus palustris* (Sommer *et al.*, 1975), *Pinus pinaster* (David *et al.*, 1978), *Picea abies* (Chapula, 1977; Bornman & Jansson, 1981). Porém, a cultura de tecidos selecionados a partir de plantas adultas é bastante difícil. Trabalhos com *Pseudotsuga menziensis* (Mirb) Franco, mostraram que é possível realizar a propagação dessas plantas adultas (Gupta, 1985). A habilidade para formar brotos vegetativos somente era expressa em embriões e plantas com menos de 2 anos de idade (Cheng, 1975, 1976, 1977; Winton, 1972; Winton & Verhagen, 1977). Porém ocorreu a necessidade de se trabalhar com plantas adultas pois a seleção das árvores para clonagem, somente pode ser realizada depois que as propriedades específicas da madeira e as características de interesse aparecerem, ou seja, nas fases adultas da planta.

Uma vez que grandes dificuldades são encontradas na cultura de tecidos realizada a partir de explantes provenientes de tecidos de plantas maduras, processos de rejuvenecimento das plantas adultas vêm sendo alvo de estudos objetivando obter tecidos jovens, os quais podem ser utilizados com maior eficiência. O rejuvenecimento pode ser realizado através de uma série de técnicas, dependendo da planta em questão. A reversão de plantas adultas de *Hedera helix* para uma fase juvenil, foi realizada através do crescimento de brotos jovens junto com brotos da planta adulta, no mesmo vaso de solução nutritiva (Pierik, 1990). Em plantas adultas de orquídeas do gênero *Cymbidium* a conversão para a fase juvenil pode ser facilmente obtida através da cultura de meristemas (Margara, 1982). Em se tratando de plantas arbóreas, alguns casos de rejuvenescimento através de cultura de meristemas são por exemplo o da uva (Boulay, 1985), *Prunus avium* (Franclet, 1987), *Pinus pinaster* (David *et al.*, 1978) e *Sequoia sempervirens* (Margara, 1982). Em muitas plantas, o rejuvenescimento se dá através de subculturas repetidas, utilizando meios de cultura suplementados por citocininas, principalmente BAP, promovendo lançamento de brotos laterais jovens (Boulay, 1985).

Em se tratando de calogênese, já foi descrito que diferentes tipos de explantes provenientes de plantas adultas de *Pseudotsuga sempervirens*, formam calos compactos se cultivados na presença de cinetina e formam calos friáveis se cultivados com 2iP porém não se observou, nenhum tipo de morfogênese nestes calos. Também já foi

descrito que fragmentos de galhos de *P. sempervirens* cultivados em meio Gamborg (1968), acrescido de NAA 10^{-6} M, IBA 10^{-5} M e fenilalanina 10^{-6} M formaram até 3 brotos axilares quando cultivados durante 4 semanas a 27°C. Quando a coleta desses brotos ocorreu no inverno, primavera ou no outono, o crescimento cessava enquanto que quando eram coletados no verão, o desenvolvimento voltou a ocorrer sob temperatura constante de 27°C. Fragmentos de galhos de plantas apresentando 80 anos de idade, também formaram até 2 brotos laterais após 2 semanas de cultivo em meio M.S. desprovido de reguladores de crescimento a 25°C.

3.7. FORMAÇÃO DE RAÍZES EM ARBÓREAS

Segundo Haissig (1984), uma profunda perturbação do metabolismo normal das plantas é necessária para a regeneração do sistema radicular e posterior estabilização termodinâmica da planta. Semelhanças anatômicas entre o desenvolvimento radicular de espécies diferentes sugerem que o metabolismo básico utilizado nessa formação seja similar para todas elas (Haissig, 1974; Favre, 1977). Para se entender a ação deste metabolismo na formação de raízes seria necessário o estudo bioquímico da planta inteira bem como na zona de enraizamento, porém muito pouco se conhece a respeito.

Vários fatores afetam a rizogênese, entre eles fatores biológicos, físicos, químicos e reguladores de crescimento. Entre os fatores biológicos, existem evidências fortes do controle genético sobre a

rizogênese (Haissig, 1985). Fatores fisiológicos como a idade da planta doadora, época em que foi coletado o material a se enraizar, tipo e tamanho do explante utilizado e se existem brotos ou folhas no explante, influenciam fortemente o enraizamento. (Franclet, 1983). Também, a manutenção do metabolismo do nitrogênio, que está relacionado com o metabolismo de carboidratos, ácidos nucleicos e proteínas, têm grande influência no enraizamento. O redirecionamento de reservas metabólicas como por exemplo a de carboidratos pode influenciar fortemente a formação de raízes.

Segundo Davies (1984), o início do enraizamento normalmente coincide com períodos de atividade cambial alta, período este de crescimento vegetativo na primavera e época na qual ocorre um balanço propício entre auxinas disponíveis e nutrientes (Gurumurti *et al.*, 1984). Porém, a coleta de material no mesmo período do florescimento da planta normalmente leva a um baixo índice de enraizamento. Estudos já mostraram que o enraizamento e o florescimento são fenômenos antagônicos do ponto de vista hormonal (Gaspar, 1981). A polaridade também é de grande importância na rizogênese uma vez que as raízes se formam sempre no final basal do material vegetal em questão, independente da sua orientação (Sinnott, 1960).

Entre os fatores físicos, o estresse hídrico, temperatura e luminosidade influenciam a rizogênese. Temperaturas altas (30°C) normalmente agem favorecendo a iniciação de primórdios radiculares enquanto temperaturas mais amenas (25°C) favorecem o alongamento

radicular. A influência da alta temperatura parece ter relação com a translocação de carboidratos e com o aumento da respiração e catabolismo de açúcares simples, que ficam estocados a temperaturas baixas (Ooiishi *et al.*, 1978; Veierskov & Anderson, 1982). Porém, Cheng e Vogui (1977) determinaram o aumento de 3 para 80% no enraizamento de plantas de *Pseudotsuga menziessii* Mirb. quando a temperatura do meio foi reduzida de 24 para 19°C juntamente com redução da sacarose e auxinas do meio.

Até o momento não há evidências consistentes da influência da luz no enraizamento uma vez que o efeito da luz varia com a planta e com o método de propagação. Contudo, há dados que demonstram que a estiolação ou redução da intensidade luminosa favorecem a formação de raízes adventícias (Nowgarede & Rondet, 1983). Um período de escuro também parece favorecer a rizogênese. O controle da organogênese através de disparos de luz podem estar relacionadas direta ou indiretamente ao acúmulo de amido em células específicas no decorrer da fotossíntese ou a eventos mediados pelo fitocromo. Este efeito de luz também pode estar relacionado aos níveis de auxinas endógenas livres (Weigel *et al.*, 1984).

A influência de reguladores de crescimento na rizogênese é um fator já bem comprovado. As auxinas geralmente são aceitas dentre os fitoreguladores como tendo papel principal na iniciação de raízes adventícias. Trabalhos demonstram que a auxina mais comumente usada no enraizamento é o IBA e o NAA e que estes são mais efetivos que o IAA (Geneve & Heuser, 1982). Estes induzem o máximo de

enraizamento quando em concentrações próximas as que induzem sintomas de toxicidade e são aplicadas imediatamente após a excisão dos explantes (Jarvis *et al.*, 1983). Estudos já demonstraram que tanto em plantas lenhosas como em não lenhosas há necessidade de constante presença de auxinas na fase inicial de enraizamento (Haissig, 1972; Ericksen & Mohamed, 1974). Concentrações altas de auxinas são necessárias para a iniciação da divisão celular e organização dos primórdios radiculares (Kantharay *et al.*, 1979), porém a aplicação de concentrações altas pode levar à inibição do crescimento ou até da iniciação radicular. Estas observações levam a crer que a segunda fase da ação das auxinas no enraizamento estão associadas com menor concentração do que a primeira (Went, 1939). Raízes adventícias normalmente são inibidas por citocininas porém algumas são necessárias em pequenas concentrações ou em proporções adequadas com auxinas.

Giberelinas vêm sendo reportadas como inibidoras da formação radicular uma vez que os seus antagonistas ou inibidores são promotores da formação de raízes (Fabijan *et al.*, 1981; Jarvis, 1985). Ocasionalmente as giberelinas podem estimular o enraizamento mas este é dependente de prévia irradiação da planta matriz e do tempo de sua aplicação (Hansen, 1976; Gaspar *et al.*, 1977).

Informações sobre a influência do etileno na formação de raízes adventícias são contraditórias (Jarvis, 1985). Experimentos usando inibidores da síntese ou ação do etileno (Fabijan *et al.*, 1981) em trabalhos de cultura de tecidos (Huxter *et al.*, 1981) sugeriram que

o etileno endógeno é inibitório nos primeiros estágios de regeneração mas estimulatórios ou até essenciais em estágios posteriores de desenvolvimento.

3.8. ORIGEM, DISTRIBUIÇÃO NATURAL E TAXONOMIA DE *Cecropia*

O gênero *Cecropia*, tipicamente americano, tem como centro de dispersão a região andina e está representado na América Tropical por mais de 100 espécies (Berg, 1978b). Introduzido na África, cresce hoje de modo espontâneo em algumas regiões (Hauman, 1948). Tem seu habitat em algumas regiões tropicais da América do Sul, principalmente no Brasil, Norte da Argentina e no Paraguai e está classificada na flora Brasileira de Martius com 37 espécies, muitas das quais tanto se assemelham que se confundem dentro do campo taxonômico. A posição sistemática de *Cecropia* tem sido por diversas vezes questionada. Link (1831) incluiu-a na família Moraceae, Miguel (1853) nas Urticaceae, Engler (1889) na subfamília Conocephaloideae de Moraceae, Corner (1962) transferiu toda esta subfamília para as Urticaceae e Berg (1978a) criou a família Cecropiaceae. Buerger (1977), Barroso (1978) e Carauta (1980) mantiveram a tradição engleriana de incluir *Cecropia* dentre as Moraceae, o que adotamos neste trabalho.

O nome vulgar mais empregado no Brasil, embaúba, é de origem Tupinambá (mba-yp-a) e significa árvore oca. A variação na pronúncia dos nomes (ambahú, ambai, ambaíba, ambaúba, embaíba, imbaúba, umbaúba, etc) deve-se ao fato do colonizador europeu não

possuir em seu vernáculo nenhuma palavra que se iniciasse com um fonema nasal e cada um percebia no som emitido pelo indígena um "a", "e", "i", "o", ou "u", na primeira sílaba (Andrade, 1981).

São árvores ou arbustos dióicos, providos de caule oco, com septos transversais nos ramos jovens sustentando uma copa com aspecto de candelabro. Sua estípula espatácea terminal é desenvolvida, decídua, intrapeciolar, encerrando suas folhas jovens, suas inflorescências e sucessivos brotos terminais. Possui folhas grandes, geralmente peltadas, inciso-radiadas e orbiculares ou arredondadas. Seus lobos possuem venação pinada e proeminente na página inferior.

Suas inflorescências axilares estão dispostas em amentos com um pedúnculo comum protegidos por uma bráctea caduca. As flores, de ambos os sexos, possuem perigônio tubular, inteiro ou bipartido em sua porção distal. Possui estames em número de dois, filetes retos e anteras grandes e exsertas. Seu estigma pode ser capitado, penicilado ou peltado e seu óvulo é basal e subortótropo. Seus frutos são do tipo aquênio de endocarpo crustáceo, tuberculado ou liso e seu endosperma é sempre presente. Possui cotilédones achatados com radícula relativamente longa. Seus embriões são retos.

3.9. Propriedades Terapêuticas

A farmacopéia do Império indicava a embaúba para o tratamento da tuberculose, diarreia, menstruações copiosas, tumores, úlceras sifilíticas, bronquites, asma, hemorroidas, diabetes, doenças venéreas e cicatrização de ferimentos em geral.

Corrêa (1923), descreveu algumas propriedades desta árvore, colocando dentre as suas utilidades, a sua eficácia no tratamento de úlceras crônicas, carcinomas e até nas afecções pulmonares. Neste mesmo trabalho, suas propriedades são descritas pelo Dr. Reidemeister, nas palpitações do coração e como poderoso diurético.

Em trabalho de 1935, realizado por Fonseca, o líquido que sai do talo fresco e da raiz de plantas de *Cecropia* é tido como cardiotônico e diurético. Esta ação terapêutica foi concretizada pelo Dr. Maurício F. Langon o qual descreve o tratamento de três pacientes com afecções cardiopulmonares e cardiorenais com resultados surpreendentes. Em 1948, Saules descreve o uso de extratos de embaúba na cura do cancro, sem porém conhecer de que forma o extrato vinha agindo, uma vez que seu princípio ativo não é conhecido.

Também em 1948, Ribeiro & Mors fizeram um estudo químico da mucilagem das estípulas da embaúba, caracterizando a presença de moléculas de ácido manurônico e galactose bem como moléculas de metilpentose. Foi utilizado neste trabalho o uso de mucilagem como

agente de cremagem do látex de seringueira. Outros trabalhos recomendam a *C. glaziovii* para o tratamento da bronquite, tosse, coqueluche e outras afecções das vias respiratórias (Moreira, 1978; Hirschorn, 1981). Acredita-se também que tenha apreciáveis efeitos homeostáticos, sendo utilizada em casos de hemoptise e hematúrias além de ação sobre o coração, aumentando a força de contração do músculo cardíaco, e como consequência promovendo abundante diurese (Cruz, 1979).

Em algumas regiões do Brasil a *C. glaziovii* é também preconizada para o tratamento da diabetes, e como anti-hipertensivo (Conceição, 1982). Mais recentemente, vêm sendo realizados trabalhos na Universidade Federal de Santa Catarina, no sentido de se caracterizar o princípio ativo responsável por tantos efeitos terapêuticos (Della Monache *et al.*, 1988).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios relacionados com a propagação vegetativa "in vivo" e "in vitro" de plantas de *Cecropia glaziovii* foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do CPQBA/UNICAMP.

4.1 Cultivo de Plantas Doadoras de Explantes

Sementes de *C. glaziovii* foram coletadas na região de Ubatuba, SP, identificando as árvores femininas para retirada dos amentos florais. Nas plantas femininas os amentos são esverdeados ou grisáceos e não caem das árvores, enquanto que os masculinos possuem coloração avermelhada e aroma característico. Os amentos foram imersos em água por 24 horas, havendo desprendimento das sementes e separação da mucilagem inibidora da germinação. As sementes foram então lavadas em água corrente, utilizando-se peneira de malha 0,8 mm, para drenagem da água. A semeadura se deu em bandejas de 12 x 30 cm, contendo solo numa camada inferior até 3 cm de espessura coberta por outra camada mais fina de 1,5 cm, de uma mistura equitativa volumetricamente de terra vegetal, areia e matéria orgânica de vegetais marinhos. As sementes foram colocadas sobre esta camada superior, e levemente recobertas com a mesma mistura, usando-se peneira para uniformizar a espessura. As bandejas foram dispostas em viveiro e protegidas com tela

"sombrite" de 50%, o qual permite a passagem de apenas 50% da luz solar. Plântulas com 2 a 4 cm de altura foram transplantadas para sacos plásticos de 2 litros, contendo o solo do próprio Campo Experimental do local de plantio definitivo. Em todas as fases a umidade do substrato foi mantida no nível da capacidade de campo. O substrato foi esterilizado, com Basamid (BASF) na dose de 20g/60 litros de substrato. Neste sistema foram produzidas 400 mudas, as quais foram transplantadas para o campo, após 45 dias de semeadura.

4.2. Obtenção de Culturas Assépticas a Partir de Sementes

Todo material não biológico que necessitou de esterilização (vidrarias, pinças, espátulas, estiletes, água destilada, etc) foi submetido a esterilização por 20 minutos a 120°C à 1 atmosfera de pressão em autoclave Phoenix, modelo AV 50. Os ensaios realizados em condições assépticas foram conduzidos em câmara de fluxo laminar marca Veco, modelo HLFS-12.

A fim de obter sementes esterilizadas tendo como objetivo a obtenção de plantas assépticas, foi realizado o seguinte tratamento:

- 1) Lavagem em H₂O destilada acrescida de 10 ml de detergente comercial;
- 2) Lavagem em H₂O destilada por 3 vezes;
- 3) Esterilização superficial com hipoclorito de sódio (1,5 % de Cl ativo) por 20 minutos;
- 4) Lavagem final por 5 vezes com H₂O destilada e autoclavada.

Sementes submetidas ao tratamento descrito acima, foram distribuídas dentro de caixas de plástico esterilizadas contendo papel de filtro autoclavado, e colocadas para germinar no interior de um germinador Fauvel EI 340 GD, sob fotoperíodo de 14 horas de luz, a 25°C. Plântulas obtidas após 7 dias, foram transferidas dentro de capela de fluxo laminar, para vidros contendo vermiculita autoclavada. A seguir as plântulas foram cultivadas em sala de crescimento, sendo umidificadas duas vezes por semana com solução de Hoagland autoclavada. As condições de cultivo foram as mesmas utilizadas no germinador, sendo que foram realizados no interior de Fitotron.

4.3. Obtenção de explantes esterilizados a partir de plantas do campo

A fim de verificar o melhor tratamento de esterilização a ser utilizado para a assepsia dos explantes provenientes do campo, foram realizados vários ensaios utilizando concentrações diferentes de hipoclorito de sódio comercial e tempos diferentes de tratamento. Os explantes coletados foram sempre os localizados dentro da estípula terminal da planta proveniente do campo. Esta estípula, após aberta, teve as suas folhas e pecíolos internos coletados, e assim sucessivamente, até que fosse atingido um estágio próximo ao ápice meristemático da planta. Estípulas, pecíolos e folhas velhas, ou seja, as não encerradas dentro da

estípula terminal foram descartadas.

Os quatro tratamentos de esterilização foram os seguintes:

1. Lavagem da estípula externa e utilização dos explantes internos sem nenhum tipo de esterilização.
2. Lavagem e esterilização da estípula externa com hipoclorito de sódio comercial (1,5 % de Cl ativo), durante 10', e utilização dos explantes internos sem esterilização.
3. Excisão da estípula externa, esterilização da 1ª estípula interna com hipoclorito de sódio comercial (1,5 % de Cl ativo), durante 10', lavagem em H₂O destilada autoclavada 5 vezes e utilização dos explantes internos sem esterilização.
4. Excisão de todos os explantes internos e esterilização destes em hipoclorito de sódio comercial (1,5 % de Cl ativo), durante 10' e posterior lavagem em H₂O destilada e autoclavada (Figura 1).

Os ápices meristemáticos isolados, foram imersos em uma solução antioxidante contendo ácido cítrico 100,0 mg/l, ácido ascórbico 100,0 mg/l e cisteína a 2,0 mg/l até serem utilizados no sentido de regenerar novas plantas assépticas (Figura 2).

Com o objetivo de avaliar a eficiência dos métodos de esterilização utilizados, o meio M.S. (Murashige & Skoog, 1962) sem fitoreguladores foi inoculado com os explantes. O meio M.S. foi acrescido de sacarose 30,0 g/l e ágar 8,0 g/l. O meio teve o seu pH ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl, autoclavado e distribuído em placas de Petri (100 mm X 25 mm) dentro de câmara de fluxo laminar. As placas de Petri foram colocadas na presença de luz constante (3000 lux) durante 5 dias e foram feitas contagens das

contaminações bacterianas ou fúngicas presentes em cada tratamento.

4.4. Estabelecimento de culturas de ápices caulinares e micropropagação

O objetivo desta fase foi averiguar as melhores combinações de fitoreguladores para o crescimento dos ápices caulinares e verificar as combinações ideais para que haja grande proliferação lateral de brotos a partir do ápice caulinar.

O meio M.S. (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de IAA, BAP, KIN, ZEA, 2iP e NAA, em diferentes concentrações formando combinações dialéticas foi inoculado com ápices caulinares das plantas provenientes da germinação asséptica de sementes ou de explantes esterilizados provenientes de plantas do campo (figura 3). As combinações dialéticas utilizadas foram :

BAP - 0; 1,0; 5,0 e 10,0mg/l	X	IAA - 0; 1,0 e 3,0 mg/l
		NAA - 0; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/l
		2iP - 0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg/l
KIN - 0; 1,0; 5,0 e 10,0 mg/l	X	IAA - 0; 1,0 e 3,0 mg/l
		NAA - 0; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/l
		2iP - 0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg/l
ZEA - 0; 0,1 mg/l	X	IAA - 0; 1,0 e 3,0 mg/l
		NAA - 0; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/l

Foram avaliados o crescimento dos brotos e a proliferação de brotos

laterais durante 90 dias de cultura. O ensaio foi realizado em frascos de 300 ml colocados sob fotoperíodo de 16h luz (3000 lux) a $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$. As culturas foram avaliadas e transferidas para frascos de 300 ml contendo meio fresco através de subculturas sucessivas, a cada mês.

4.5. Indução de calos

Uma vez que não foram encontrados dados na literatura referentes à cultura de tecidos de embaúba, foram utilizados como fonte de explantes para indução de calos, estípulas, folhas e pecíolos jovens encerrados dentro da estípula terminal de plantas adultas coletadas no campo (Figura 1). Também foram utilizadas plantas obtidas pela germinação de sementes esterilizadas e as obtidas pelo cultivo de ápices caulinares (Figura 2).

O material vegetal oriundo do campo, é basicamente composto por estípulas internas que encerram folhas jovens com seus pecíolos jovens. Foram utilizados como explantes, segmentos de folhas ($0,5 \text{ cm}^2$), de estípulas ($0,5 \text{ cm}^2$) e de pecíolos (cortes de $0,3 \text{ cm}$), previamente esterilizados.

O material vegetal proveniente de plantas obtidas pela germinação de sementes esterilizados ou pelo desenvolvimento dos ápices meristemáticos, basicamente é composto por hipocótilo, folhas, pecíolos e novos ápices caulinares e brotos apicais. Neste caso, a fonte de explantes já se encontra esterilizado e não houve

necessidade de novas esterilizações.

Meio de cultura M.S. acrescido das citocininas BAP, 2iP e KIN e da auxina 2,4-D em combinações dialélicas foram inoculados com os explantes esterilizados. As concentrações de fitoreguladores utilizadas nas combinações dialélicas foram as seguintes:

BAP - 0; 0,1; 1,0; 3,0mg/l X 2,4-D - 0; 1,0; 3,0; 5,0 e 10,0 mg/l
IAA - 0; 1,0 e 3,0 mg/l

KIN - 0; 1,0 e 3,0 mg/l X IAA - 0; 1,0 e 3,0 mg/l
2,4-D - 0; 1,0; 3,0; 5,0 e 10,0mg/l

2,4-D - 0; 1,0; 3,0; 5,0 e 10,0 mg/l X 2iP : 0; 1,0; 3,0 mg/l

O meio M.S. utilizado foi suplementado com sacarose 30%, mio-inositol 100 mg/l e ágar 0,7%. O pH do meio de cultura sempre foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ medido antes da autoclavagem. As culturas foram mantidas em salas de crescimento, tanto na presença de luz sob fotoperíodo de 16h de luz (3000 lux) quanto no escuro constante, à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

As leituras referentes ao tamanho dos calos obtidos foram realizadas a cada 40 dias após a inoculação, através de contagens de números de calos por placa e dando-se notas (1, 2, 3 e 4) para cada tratamento, avaliando-se o tamanho visual dos calos (Tabela 1).

Foram transferidos para o meio de regeneração calos maiores que 5 mm de diâmetro. As avaliações foram realizadas semanalmente e foram observadas mudanças na constituição do calo bem como o aparecimento de estruturas que pudessem sugerir regeneração de órgãos ou embriões. Foram realizados tratamentos na presença de luz (fotoperíodo de 16 horas de luz a 3000 lux) e no escuro.

4.7. Enraizamento

Tentativas de enraizamento foram realizadas transferindo-se eixos caulinares jovens para meio de cultura M.S. sem fitoreguladores e na presença das auxinas IAA, IBA e NAA. As concentrações utilizadas foram:

IAA -> 0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg/l

IBA -> 0; 0,1; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mg/l

NAA -> 0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg/l

As avaliações foram realizadas, considerando o tempo de enraizamento e o número de raízes liberadas por broto. Os tratamentos foram realizados na presença de luz (fotoperíodo de 16 h de luz a 3000 lux) e no escuro.

4.8. Aclimação

Plantas regeneradas através da cultura de ápices caulinares ou obtidas pela diferenciação de calos, após enraizados, foram transferidos para substrato contendo terra e vermiculita (3:1) em

condições assépticas (dentro de vidros de 300 ml esterilizados) e não assépticas (em copo de plástico cobertos com sacos plásticos transparentes). As plantas foram mantidas sob alta umidade (100%) em temperaturas amenas de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 2 semanas. Após este período, as mudas dos dois tratamentos foram transferidas para casa de vegetação. Posteriormente, as mudas que se mantiveram verdes e saudáveis, foram transferidas primeiramente para viveiro e posteriormente para o campo onde foram observadas até a sua adaptação.

4.9. Testes Estatísticos

Todos os ensaios foram submetidos a análise de variância e a comparação de médias foi realizada através do teste estatístico de Tukey (Gomes, 1982), com intervalos de confiança ao nível de 5%. Foi utilizado com este intuito o programa Sanest2 (Zonta & Machado, 1992).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivo de Plantas

O percentual de germinação aos 12 dias de semeadura foi alto (cerca de 95%) e as plântulas eram vigorosas e apresentavam aspecto normal. A técnica de imersão em água por 24 horas foi fundamental para a retirada da mucilagem que tem propriedade de inibir a germinação (dados não apresentados).

5.2. Obtenção de plantas esterilizadas a partir de sementes.

O tratamento realizado para desinfecção de sementes foi altamente eficiente, sendo que apenas 12% das sementes apresentaram contaminações fúngicas após 7 dias de inoculação. Não houve contaminações bacterianas em nenhum tratamento. A germinação ocorreu 5 dias após a semeadura dentro do germinador (dados não apresentados).

As plântulas que não apresentaram contaminações após 7 dias de inoculação, tiveram 100% de adaptação quando transferidos para vidros de 300 ml contendo vermiculita autoclavada. Não se observou nenhuma contaminação bacteriana nesta fase.

5.3. Obtenção de culturas esterilizadas a partir de plantas do campo.

Não foram observadas contaminações na cultura de ápices caulinares. De 28 ápices caulinares , foram obtidas 21 plântulas esterilizados sendo que 7 sofreram oxidação logo nos primeiros dias. Os ápices meristemáticos oxidados foram descartados.

Conforme descrito na tabela 2, de todos os tratamentos de esterilização de explantes, 2 foram mais eficientes, sendo que o tratamento 3 foi o que resultou em menor percentagem de contaminação.

No tratamento 1, observou-se que apenas a lavagem da estípula externa não foi suficiente para eliminar os contaminantes, e o material interno apresentou alto grau de contaminação. No tratamento 2, observou-se uma melhora acentuada nos resultados porém a retirada da estípula externa e esterilização da 1ª estípula interna apresentou resultados melhores. A esterilização dos explantes internos (tratamento 4) levou a um baixo grau de contaminação, porém acarretou uma oxidação seguida de necrose elevada.

TABELA 2 - Eficiência dos processos de esterilização dos diferentes tipos de explantes de *Cecropia glaziovii*. Valores referentes a média de 3 experimentos.

TRATAMENTOS	% DE CONTAMINAÇÃO		
	FOLHAS	PECÍOLOS	ESTÍPULA
1. Lavagem da estípula externa com água esterilizada e utilização dos explantes internos sem esterilização	70	60	85
2. Lavagem e esterilização da estípula externa com hipoclorito de sódio (1,5% de Cl) durante 10' e utilização dos explantes internos sem esterilização.	25	15	55
3. Excisão da estípula externa, esterilização da 1ª estípula interna com hipoclorito de sódio (1,5 % de Cl), durante 10', lavagem em H ₂ O destilada autoclavada 5 vezes e utilização dos explantes internos sem esterilização.	12	10	22
4. Excisão de todos os explantes internos e esterilização com hipoclorito de Sódio (1,5 % de Cl) durante 10'.	12*	8*	17*

* Explantes apresentaram alto grau de oxidação seguido de necrose.

Vários trabalhos de propagação de arbóreas "in vitro" relatam dificuldades na esterilização de explantes retirados da planta doadora. Predieri *et al.* (1989), mostraram a dificuldade de se eliminar contaminantes internos de folhas de *Pirus communis* L., necessitando utilizar antibióticos na eliminação de bactérias endógenas. Em *Ficus religiosa* L. (Narayan & Jaiswal, 1986) e *Morus bombycis* Koidz (Yakuwa & Oka, 1988), o tratamento de folhas para futura inoculação objetivando formação de calos, necessitou de tratamentos rígidos de esterilização, utilizando Cetavlon, e esterilização com solução de cloreto de mercúrio. Em *Prunus persica* L., houve a necessidade de após a esterilização com hipoclorito de sódio, utilizar tratamentos com antibióticos do tipo penicilina e estreptomicina para solucionar os problemas de contaminação bacteriana (Hammerschlag, 1982). No caso de cultivares de maçã, também são descritos inúmeros trabalhos onde houve grande dificuldade na esterilização de explantes para futura micropropagação, como por exemplo o estudo de Jones *et al.*, (1977), onde brotos foram tratados com MannoXol, antes de serem mergulhados em hipoclorito de sódio, e novamente em Monnoxol, para serem utilizados em culturas futuras. O estudo com *Cecropia glaziovii*, demonstrou que com tratamentos de esterilização de rotina, foi possível obter explantes livres de contaminação, sendo que apenas tratamentos com hipoclorito de sódio seguido de lavagens com H₂O destilada autoclavada foram suficientes para eliminar quase que totalmente as contaminações superficiais presentes. Resultados semelhantes foram também obtidos para outras espécies (Kim *et al.*, 1985; Baviera *et al.*, 1989). A utilização dos explantes presentes

dentro da estípula terminal se mostrou bastante eficiente, uma vez que os explantes praticamente se apresentaram isentos de contaminações.

5.4. Cultura de Ápices caulinares

Como mostrado na tabela 3 , os ápices caulinares inoculados em meio M.S. acrescido de BAP 10,0 mg/l + NAA 2,0 mg/l apresentaram, após 40 dias de cultura, grande proliferação lateral. Foi observado crescimento de até 15 brotos/ápice caulinar. Ápices caulinares, inoculados em meio M.S. acrescido de apenas BAP 10,0 mg/l , BAP 10,0 mg/l + IAA 1,0 mg/l e BAP 10,0 mg/l + NAA 1,0 mg/l e BAP 5,0 mg/l também apresentaram proliferação lateral abundante porém estatisticamente inferior ao tratamento acima mencionado.(Tabela 3 e Anexo, Quadro 1).

Nos tratamentos em que se acrescentou cinetina e 2iP houve baixa proliferação lateral de brotos sendo que quanto maiores foram as suas concentrações, menores foram os valores obtidos de crescimento lateral. Na Tabela 3 apenas estão relacionados os tratamentos que produziram resultados favoráveis. A combinação de BAP e NAA parece ser bastante efetiva, visto que outros autores já obtiveram resultados semelhantes em outras culturas de arbóreas. Borkowska (1989) obteve altos índices de propagação de brotos de cereja quando utilizou uma combinação de BAP 1,5mg/l + NAA 0,1 mg/l, porém em concentrações maiores houve decréscimo do número de brotos propagados. Da mesma forma, a utilização das citocininas

TABELA 3 - Efeito de diferentes combinações de fitoreguladores na proliferação de brotos laterais de *C. glaziovii*, a partir de brotos apicais e ou laterais. Resultados obtidos após 45 dias de cultura.

FITOREGULADORES (mg/l)	Número de brotações por broto inoculado
BAP 1,0	2,00 gh
BAP 5,0	7,55 cd
BAP 10,0	9,35 b
BAP 10,0/NAA 1,0	8,70 bc
BAP 10,0/NAA 2,0	15,10 a
BAP 10,0/NAA 5,0	7,00 d
KIN 5,0	3,20 fg
KIN 10,0	0,75 h
KIN 5,0/IAA 1,0	0,90 h
KIN 5,0/2iP 0,1	2,60 g
KIN 5,0/2iP 0,5	2,15 gh
KIN 5,0/2iP 1,0	1,00 h
BAP 5,0/IAA 1,0	5,10 e
BAP 10,0/IAA 1,0	8,20 bcd
BAP 10,0/2iP 0,1	4,20 ef
dms : 1,44	
C.V. : 26,33%	

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Resultados obtidos pela média de 20 repetições.

KIN, 2iP e ZEA não surtiram efeito positivo quando combinadas com a auxina NAA. Em *C. glaziovii*, pode-se observar que a influência da citocinina BAP é preponderante na propagação uma vez que mesmo em ensaios em que é utilizada isoladamente, há formação de até 9,35 brotos/ápice caulinar. O efeito da auxina NAA foi positivo e sinérgico quando combinado com BAP 10,0 mg/l. O IAA combinado com BAP 10,0 mg/l apresentou resultados expresivos de formação de até 8,20 brotos/ápice porém o seu efeito foi antagônico na combinação. Em trabalhos prévios Stimart & Harbage (1989) demonstraram que quando ápices caulinares de *Pirus calleryana*

Deene. foram inoculados em meio contendo combinações de BAP e IBA, a citocinina teve influência marcante em concentrações baixas levando a produção de até 26 brotos por explante. O aumento da concentração desta citocinina levou à diminuição da proliferação de brotos, ao contrário dos resultados obtidos com *C. glaziovii*. Nas combinações com a auxina, o autor também obteve diminuição da proliferação lateral. No presente estudo obtivemos um aumento significativo de formação de brotos quando foi adicionada a auxina NAA 1,0 mg/l à citocinina BAP.

Em cultura de brotos de maçã, Jones *et al.* (1977), também obteve resultados satisfatórios produzindo até 42 brotos por ápice de maçã, utilizando meio de cultura suplementado com BAP 1,0 mg/l + IBA 1,0 mg/l. Neste caso o autor utilizou concentrações baixas de fitoreguladores, resultado este mais uma vez contrário ao obtido para *C. glaziovii*.

Após os resultados indicarem o tratamento BAP 10,0 mg/l + NAA 2,0 mg/l como o mais eficiente na propagação de brotos, as subculturas foram sempre realizadas através deste tratamento.

5.5. Indução de calos

Os resultados obtidos para a formação de calos de *C. glaziovii* envolveram a interação de 3 fatores distintos (luminosidade, tipo de explante, meios de cultura). Os resultados foram separados de forma a avaliar inicialmente os valores de crescimento de calos

obtidos diante da influência de cada fator. Posteriormente, estes foram analisados conjuntamente de forma a avaliar a interação entre os fatores (Anexo, Quadro 2). Somente foram apresentados nas tabelas de resultados, os que tiveram valores significativos, sendo que as interações que apresentaram resultados não significativos não foram incluídas.

-Efeitos da interação hormonal

Como mostrado na tabela 4, pode-se observar que os meios de cultura acrescidos de 2,4-D 5,0 mg/l e 10,0 mg/l na ausência de BAP ou acrescido de BAP 1,0 e 3,0 mg/l foram os que resultaram em maiores valores de crescimento (2,20, 2,33 e 2,13 respectivamente) .

TABELA 4 - Efeito de diferentes fitoreguladores na indução de calos de *C. glaziovii*. Nesta tabela não estão sendo considerados os fatores luminosidade e tipo de explante. Valores obtidos após 40 dias de cultura, através de avaliação realizada de acordo com a tabela 1.

FITOREGULADORES (mg/l)	CRESCIMENTO
2,4-D 1,0	1,43 c
2,4-D 5,0	2,2 a
2,4-D 10,0	1,66 bc
2,4-D 1,0/BAP 0,1	1,43 c
2,4-D 1,0/BAP 1,0	1,5 c
2,4-D 1,0/BAP 3,0	1,16 c
2,4-D 5,0/BAP 1,0	2,33 a
2,4-D 5,0/BAP 3,0	2,13 ab
2,4-D 3,0/2iP 1,0	1,4 c

dms : 0,52

C.V. : 14,95%

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%

-Efeitos da luz

Os resultados apresentados na tabela 5 e no histograma 1, indicam que os tratamentos realizados no escuro tiveram resultados mais efetivos que os realizados na presença de luz. Calos obtidos no escuro tiveram valores de crescimento da ordem de 2,15 enquanto que calos obtidos sob efeito da luz tiveram valores da ordem de 1,23, valores estes que diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey.

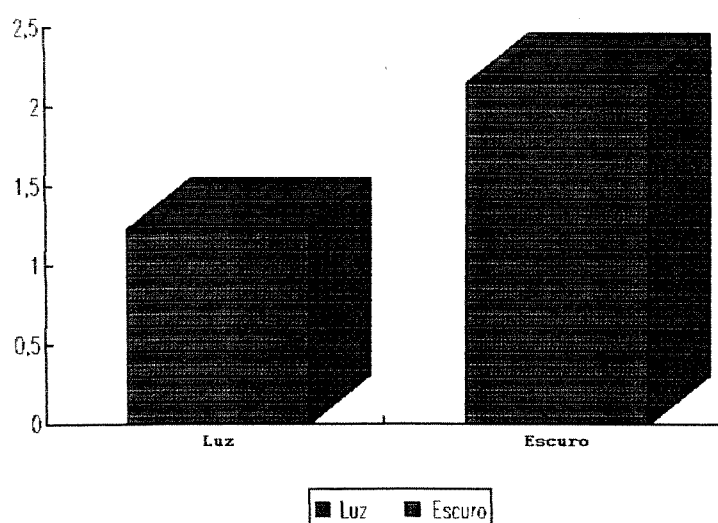
TABELA 5 e HISTOGRAMA 1 - Efeito do fator luz sobre a formação de calos de *Cecropia glaziovii*. Foram excluídos os fatores combinação de fitoreguladores e tipo de explante. Valores obtidos após 40 dias de cultura, através de avaliação realizada de acordo com a tabela 1.

TRATAMENTO	TAMANHO DOS CALOS
LUZ	1,23 b
ESCURO	2,15 a

dms : 0,14

C.V. : 14,95%

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.



-Efeitos do tipo de explante

A tabela 6 e histograma 2, mostram os resultados do efeito dos tipos de explantes na obtenção de calos. O explante que levou à maior frequência de indução de calos foi o pecíolo, resultado este que diferiu significativamente dos outros dois tipos de explantes (folha e estípula).

-Efeitos da interação entre luz e tipo de explante

Na tabela 7 e histograma 3, os resultados de formação de calos mostram interação significativa dos fatores tipo de explantes e luminosidade. Os melhores resultados foram os obtidos pela interação entre o fator escuro e os explantes pecíolos e folhas. Os valores de crescimento de calos foram de 2,64 e 2,06 respectivamente, confirmando os resultados obtidos na tabela 7 os quais são de alta frequência de indução de calos.

-Efeito da interação dos três fatores

Nas tabelas 8, 9 e 10 estão representados os resultados das interações entre os três tipos de explantes com os diferentes tipos de combinações de fitoreguladores, sob influência da luz ou no escuro. De acordo com os resultados mostrados na tabela 8, a frequência de formação de calos utilizando o explante estípula foi bastante baixa, sendo que sob efeito de luz não houve formação de

TABELA 6 e HISTOGRAMA 2 - Efeito de diferentes tipos de explantes (pecíolo, folha e estípula) na formação de calos de *C. glaziovii*, avaliados de acordo com a tabela 1. Foram excluídos os fatores luminosidade e tipo de meios de cultura.

EXPLANTES	TAMANHO DOS CALOS
PECÍOLO	2,03 a
FOLHA	1,67 b
ESTÍPULA	1,37 c

dms : 0.30
C.V. : 14.95%

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

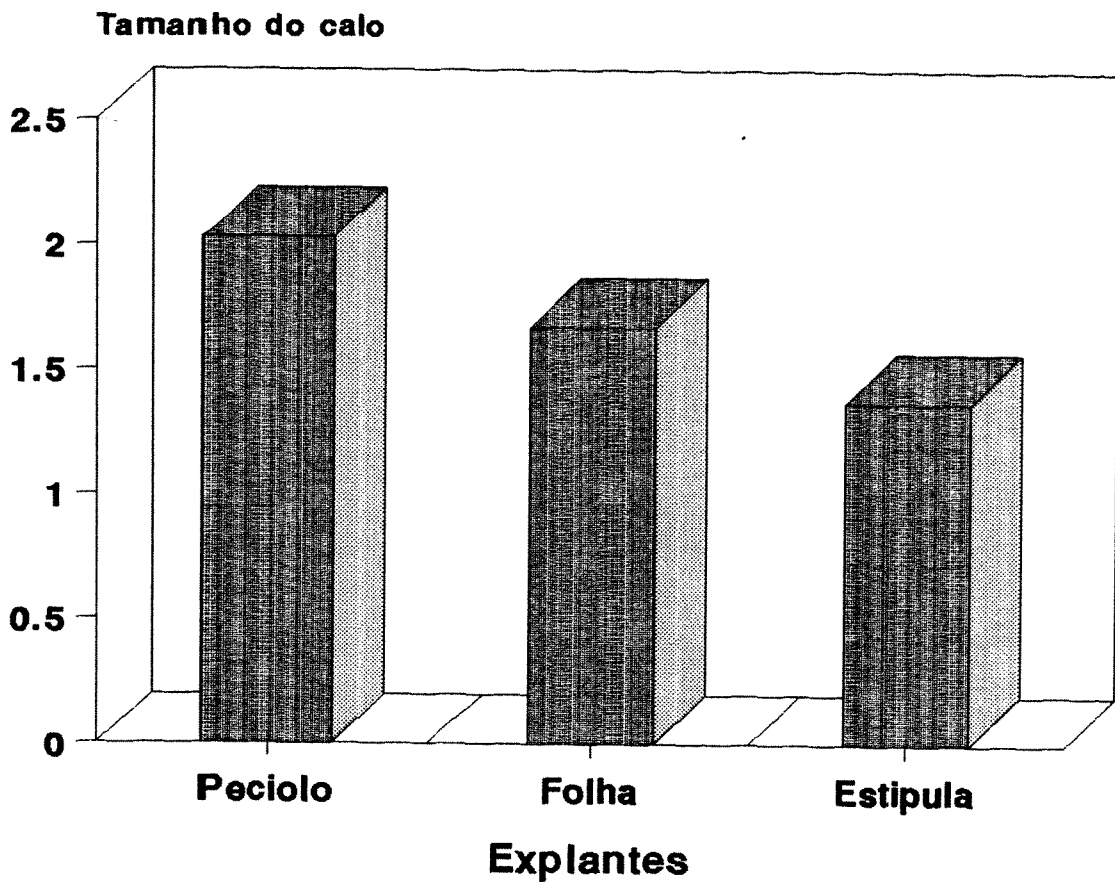


TABELA 7 e HISTOGRAMA 3- Efeito da luminosidade no crescimento de *C. glaziovii* a partir de diferentes tipos de explantes. O tipo de meio utilizado não está sendo considerado. Valores obtidos após 40 dias de cultura.

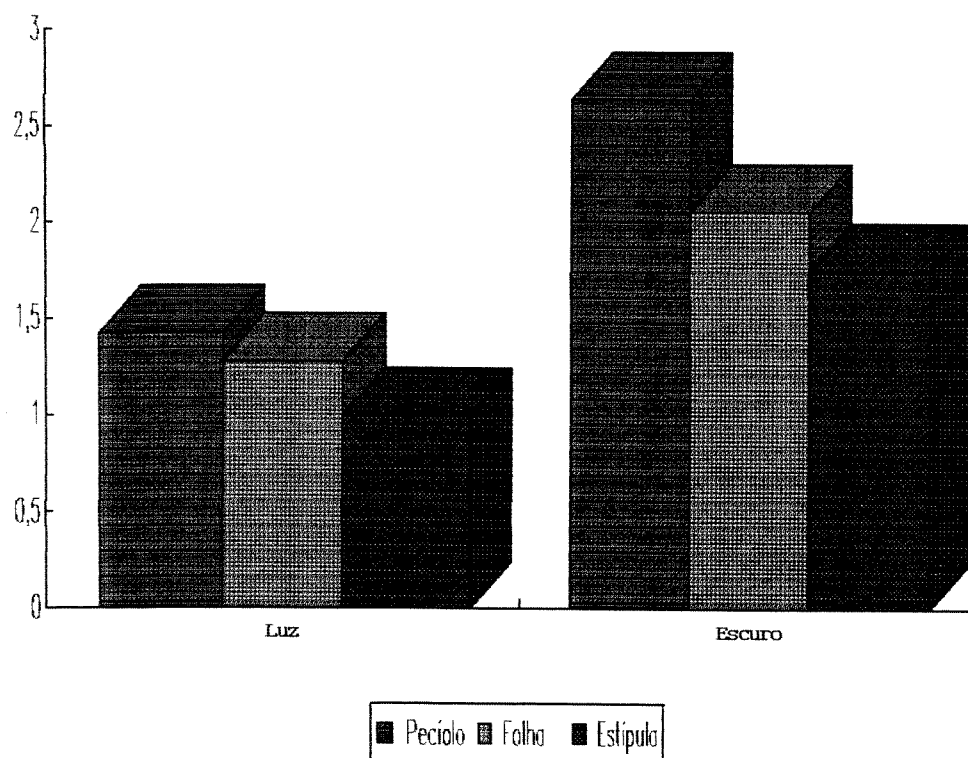
EXPLANTES	LUZ	ESCURO
PECÍOLO	1.42 a B	2.64 a A
FOLHA	1.28 ab B	2.06 b A
ESTÍPULA	1.0 b B	1.75 c A

dms: A,B - 0,25

dms: a,b,c - 0,30

C.V. : 14,95%

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5%.



calos. Já no escuro, nos tratamentos em que se utilizou 2,4-D como fitoregulador, sempre houve uma ligeira formação de calos, com exceção do tratamento no qual se acrescentou BAP a 3,0 mg/l. A tabela 9 demonstra os resultados obtidos para formação de calos a partir de folhas. Observamos que os resultados foram ligeiramente melhores sendo que nos tratamentos utilizando apenas 2,4-D 5,0 mg/l ou este fitoregulador combinado com BAP 1,0 ou 3,0 mg/l induziu formação de pequenos calos, mesmo sob influência da luz. Já nos tratamentos realizados no escuro, os resultados foram superiores, sendo que os tratamentos utilizando 2,4-D 5,0 mg/l isoladamente ou em combinação com BAP 0,1, 1,0 e 3,0 mg/l foram os que geraram uma maior frequência de indução de calos. Na tabela 10, podemos observar os resultados obtidos quando utilizamos pecíolos como a fonte de explantes. Os resultados demonstraram que entre os três tipos de explantes estudados, o pecíolo foi o que produziu a mais alta frequência para indução de calos em *C. glaziovii*. Foram obtidos calos com valores de crescimento superiores a 3,0 (Tabela 1) quando foram acrescidos ao meio de cultura 2,4-D 5,0mg/l isoladamente ou combinado com BAP 1,0 e 3,0 mg/l no escuro (figura 4). Pode-se observar também, que no tratamento realizado utilizando meio 2,4-D 5,0mg/l + BAP 1,0 mg/l sob influência da luz, houve

TABELA 8 - Efeito das diferentes interações entre combinações hormonais, dentro do explante estípula, sob influência de luminosidade ou não, no tamanho de calos obtidos. Valores obtidos após 40 dias de cultura.

ESTÍPULA

FITOREGULADORES (mg/l)	LUZ	ESCURO
2,4-D 1,0	1,0 a B	1,8 a A
2,4-D 5,0	1,0 a B	2,2 a A
2,4-D 10,0	1,0 a B	2,2 a A
2,4-D 1,0/BAP 0,1	1,0 a A	1,6 a A
2,4-D 1,0/BAP 1,0	1,0 a B	1,8 a A
2,4-D 1,0/BAP 3,0	1,0 a A	1,0 a A
2,4-D 5,0/BAP 1,0	1,0 a B	1,8 a A
2,4-D 5,0/BAP 3,0	1,0 a B	1,8 a A
2,4-D 3,0/2iP 1,0	1,0 a A	1,6 a A
dms: a,b,c... -	1,27	
dms: A,B... -	0,76	
C.V. : 14,95%		

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey so nível de 5% de probabilidade.

formação de calos com valores de crescimento 3,0 o que leva a possibilidade de se induzir calogênese em condições de luminosidade.

Vários trabalhos descrevem a formação de calos em arbóreas utilizando folhas como explante mais adequado (Kim *et al.*, 1985; Nayrayan & Jaiswal, 1986; Welandar, 1987; James *et al.*, 1988; Laimer *et al.*, 1988; Leblay *et al.*, 1991). Segundo James *et al.* (1984), para *Malus*, o melhor explante é o tecido nucelar enquanto que Hammerschlag *et al.* (1985) utilizaram embriões imaturos para indução de calos em *Prunus persica*. Da mesma forma,

TABELA 9 - Efeito das diferentes interações entre combinações hormonais, dentro do explante folha, sob influência de luminosidade ou não, no tamanho de calos obtidos. Valores obtidos após 40 dias de cultura.

F O L H A

FITOREGULADORES (mg/l)	LUZ	ESCURO
2,4-D 1,0	1,0 a B	1,8abc A
2,4-D 5,0	1,8 a B	2,8 ab A
2,4-D 10,0	1,0 a B	2,0 abc A
2,4-D 1,0/BAP 0,1	1,0 a B	2,2 abc A
2,4-D 1,0/BAP 1,0	1,0 a B	2,0 abc A
2,4-D 1,0/BAP 3,0	1,0 a A	1,0 c A
2,4-D 5,0/BAP 1,0	2,0 a A	2,2 abc A
2,4-D 5,0/BAP 3,0	1,8 a B	3,0 a A
2,4-D 3,0/2iP 1,0	1,0 a A	1,6 bc A
dms: a,b,c... - 1,27		
dms: A,B... - 0,76		
C.V. : 14,95%		

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

em *Prunus armeniaca*, o melhor explante foram embriões imaturos. Em *C. glaziovii*, não houve grande formação de calos em folhas, mesmo quando estas foram inoculadas em meio de cultura contendo fitoreguladores nas concentrações utilizadas pelos autores acima citados. Em *Cecrópia*, pecíolos foram a fonte de explantes mais adequada para formação de calos. Da mesma maneira, a ausência de luz foi um fator preponderante na formação de calos concordando com trabalhos de outros autores (Laimer *et al.* 1988; Pieterse, 1989; Leblay *et al.* 1991).

TABELA 10 - Efeito das diferentes interações entre combinações hormonais, dentro do explante pecíolo, sob influência de luminosidade ou não, no tamanho de calos obtidos. Valores obtidos após 40 dias de cultura.

P E C Í O L O

FITOREGULADORES (mg/l)	LUZ	ESCURO
2,4-D 1,0	1,0 b B	2,0 b A
2,4-D 5,0	1,6 b B	3,8 a A
2,4-D 10,0	1,6 b A	2,2 b A
2,4-D 1,0/BAP 0,1	1,0 b B	1,8 b A
2,4-D 1,0/BAP 1,0	1,0 b B	2,2 b A
2,4-D 1,0/BAP 3,0	1,0 b B	2,0 b A
2,4-D 5,0/BAP 1,0	3,0 a B	4,0 a A
2,4-D 5,0/BAP 3,0	1,6 b B	3,6 a A
2,4-D 3,0/2iP 1,0	1,0 b B	2,2 b A

dms: a,b...- 1,27

dms: A,B...- 0,76

C.V. : 14,95%

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a nível de 5% de probabilidade.

Ao contrário de trabalhos onde a presença de BAP e NAA foi necessária para a indução de calos (Laimer *et al.*, 1988; Welander, 1988; Leblay *et al.* 1991), em *C. glaziovii* houve sempre necessidade da presença de 2,4-D em concentrações de 5,0 a 10,0 mg/l no meio de cultura. Interessante ressaltar que em certos casos houve inibição da formação de calos quando BAP foi acrescentado em combinação com 2,4-D 1,0mg/l o qual isoladamente induziu formação de calos mesmo que em pequena quantidade.

Segundo Bonga (1977) em revisão de trabalhos com arbóreas, são inúmeras as combinações hormonais que podem levar à indução de calos em diferentes plantas. Interessante é ressaltar a

especificidade de cada planta com certos fitoreguladores exógenos para cada tipo de indução morfogênica. Em *C. glaziovii*, o efeito de fitoreguladores como 2iP, KIN, e NAA foram praticamente nulos no que diz respeito à formação de calos, enquanto que o 2,4-D foi fundamental para a sua indução. O BAP teve efeito sinérgico em alguns casos, porém quando combinado em concentração de 3,0 mg/l com 2,4-D 5,0 mg/l seu efeito foi negativo em tratamentos utilizando pecíolos como fonte de explantes na presença de luz (Tabela 10).

5.6. Regeneração de Plantas a Partir de Calos

De acordo com a tabela 11, onde apenas estão relacionados os resultados que foram relevantes, pode-se observar que os fitoreguladores ZEA e 2,4-D foram os mais eficientes na regeneração de brotos a partir de calos (figura 5), (Anexo, Quadro 3). Ensaios nos quais calos foram transferidos para meios contendo ZEA 0,1 mg/l mostraram que após 50 dias de cultura, até 6,53 brotos regenerados por calo inoculado. Este tratamento, segundo o teste de Tukey, foi tão eficiente quanto o realizado combinando ZEA 0,1 mg/l com 2,4-D 1,0 mg/l o qual levou a regeneração de 5,40 brotos/calos. Outros resultados satisfatórios foram obtidos com a combinação de ZEA 0,1 mg/l + 2,4-D 0,5 mg/l, e no tratamento no qual se usou apenas 2,4-D 10,0 mg/l. Neste caso, o início da organogênese se deu apenas após 80 dias de cultura, período no qual foram feitas 3 subculturas em intervalos de 25 dias. Não houve diferença significativa entre estes dois tratamentos (4,20 e 4,13 brotos/calos

respectivamente)(Tabela 11). Em *Prunus persica*, segundo Hammerschlag *et al.*(1985), a regeneração de plantas a partir de calos se deu em uma combinação dos fitoreguladores NAA e BAP em baixas concentrações, sendo que os calos com capacidade regenerativa foram somente aqueles obtidos a partir de embriões, e que se apresentavam com aspecto compacto concordando com trabalhos de Hammerschlag 1982, no qual houve regeneração desta espécie a partir de calos compactos, porém oriundos de endosperma de *P. persica*. Já em *Prunus armeniaca* L., Pieterse (1989) descreve a formação de calos a partir de embriões imaturos, porém a indução de regeneração foi obtida pela combinação de BAP com 2,4-D em concentrações baixas. Em *C. glaziovii*, o aspecto morfológico dos calos e o tipo de explante utilizado na sua formação foram fatores preponderantes na regeneração. A presença de ZEA e altas concentrações de 2,4-D também tiveram influência positiva na formação de calos. Já em *Pirus communis* L., segundo Leblay *et al.* (1991), a regeneração ocorreu apenas em calos provenientes de explantes de folhas, submetidos a tratamento com os fitoreguladores NAA e TDZ em baixas concentrações, sendo que de grande importância, foi o tipo de meio no qual os calos foram induzidos (BAP e IBA em concentrações baixas). Estes autores também relatam a regeneração direta de brotos a partir de folhas inoculadas no meio regenerativo. Em trabalhos de Welandar (1988), utilizando folhas de *Malus domestica* como explantes para formação de calos e futura regeneração de brotos, houve apenas uma pequena regeneração indireta em calos colocados em meio acrescido de BAP e NAA, sendo

TABELA 11 — Efeito de diferentes meios de cultura na obtenção de brotos de *C. glaziovii* a partir de calos provenientes de cultura de pecíolos. Observações realizadas de 30 dias após a inoculação.

FITOREGULADORES (mg/l)	Número de Brotos por Calo
2,4-D 10,0	4,13 b
2,4-D 20,0	1,8 cd
2,4-D 10,0/BAP 1,0	0,4 de
2,4-D 20,0/BAP 1,0	0,13 e
2,4-D 5,0/BAP 5,0	0,73 cde
2,4-D 10,0/BAP 5,0	0,20 e
2,4-D 10,0/2iP 1,0	1,26 cde
2,4-D 20,0/2iP 1,0	0,40 de
ZEA 0,1	6,53 a
ZEA 0,1/2,4-D 1,0	5,40 ab
ZEA 0,1/2,4-D 0,5	4,20 b
ZEA 0,1/2,4-D 10,0	2,06 c

dms: a,b,c... - 1,53

C.V. : 55,99%

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

que todos os outros resultados foram obtidos por regeneração direta. Em *C. glaziovii*, não foi observada nenhuma regeneração direta a partir de qualquer tipo de explante, porém foi de grande importância na regeneração indireta, a utilização de pecíolos como explante para formação de calos. Não houve diferenças na regeneração de brotos entre calos provenientes de pecíolos obtidos por diferentes combinações de fitoreguladores.

Não foi observada diferenciação dos calos ao nível de organogênese ou embriogênese quando estes foram transferidos para meios contendo IAA (0,1, 1,0, 5,0 mg/l) mesmo quando este foi combinado com diferentes concentrações de BAP (1,0, 5,0 mg/l) e 2iP (1,0, 5,0mg/l). Meios contendo apenas BAP (1,0 e 5,0 mg/l) , 2iP (1,0 e

5,0 mg/l) ou 2,4-D (1,0 e 5,0 mg/l) também não induziram nenhuma diferenciação.

Meios contendo BAP (1,0 e 5,0 mg/l) apenas induziram organogênese quando combinados com 2,4-D em concentrações altas (5,0, 10,0, 20,0 mg/l). Este resultado diferiu do trabalho de Pieterse (1989), onde este autor utiliza BAP e 2,4-D na regeneração de brotos de *Prunus armeniaca* a partir de calos, utilizando baixas concentrações de 2,4-D. Outros ensaios combinando 2,4-D (1,0, 5,0, 10,0, 20,0 mg/l) com 2iP (1,0 e 5,0 mg/l) também levaram a alguns resultados ao nível de organogênese, porém somente quando as concentrações de 2,4-D utilizadas foram altas (10,0, 20,0 mg/l) e as de 2iP baixas (1,0 mg/l) (Tabela 11).

Foi observado também, que quanto maior a concentração de 2,4-D na combinação com ZEA 0,1 mg/l, houve decréscimo no número de brotos obtidos. O 2,4-D foi bastante eficiente nos ensaios nos quais não houve combinação com outros hormônios (Tabela 11).

Não foi observada nenhuma diferenciação dos calos *via* embriogênese. Não foi encontrada nenhuma estrutura semelhante a embriões somáticos nos tratamentos. Houve sim, diferenciações organogênicas nas quais foram identificados formação de raízes, folhas e brotos se regenerando de calos de aparência friável e esbranquiçada normalmente obtidos a partir de pecíolos (figuras 5 e 6) e tabela 12.

TABELA 12 - Efeitos de algumas combinações hormonais sobre explantes de *Cecropia glaziovii*. A incubação das culturas foi realizada em condições de escuro.

FITOREGULADORES

BAP	2,4-D	IAA	OBSERVAÇÕES
0,0	0,0	0,0	E - inalteradas P - formações globulares F - inalteradas
0,0	1,0	0,0	E - calos e pontuações brancas P - calos, raízes e pontuações brancas F - poucas formações globulares
0,0	5,0	0,0	E - muitas raízes P - calos nas bordas F - calos nas bordas
0,0	10,0	0,0	E - calos nas bordas P - calos F - calos nas bordas
0,0	20,0	0,0	E - calos amarelos nas bordas P - calos F - calos e formação de raízes
1,0	0,0	0,0	E - formações globulares pequenas P - calos e raízes F - formações globulares pequenas
5,0	0,0	0,0	E - inalteradas P - inalterados F - formações globulares pequenas
1,0	1,0	0,0	E - calos com formações globulares P - inalterados F - pouca formação de calos
1,0	5,0	0,0	E - poucos calos P - pontuações brancas F - pontuações brancas
1,0	10,0	0,0	E - calos nas bordas P - calos e pontuações brancas F - calos nas bordas
1,0	20,0	0,0	E - calos nas bordas P - calos F - calos nas bordas

			Continuação
5,0	1,0	0,0	E - inalteradas P - formações globulares pequenas F - formações globulares pequenas
5,0	5,0	0,0	E - inalteradas P - inalterados F - inalteradas
5,0	10,0	0,0	E - calos nas bordas P - poucos calos nas bordas F - inalteradas
5,0	20,0	0,0	E - muitos calos nas bordas P - poucos calos nas bordas F - inalteradas
0,0	0,0	0,1	E - inalteradas P - inalterados F - com raízes
0,0	0,0	1,0	E - inalteradas P - inalterados F - com raízes
0,0	0,0	5,0	E - inalteradas P - inalterados F - com raízes
1,0	0,0	0,1	E - inalteradas P - inalterados F - inalteradas
1,0	0,0	1,0	E - inalteradas P - formações globulares F - inalteradas
1,0	0,0	5,0	E - inalteradas P - formações globulares F - inalteradas
5,0	0,0	0,1	E - inalteradas P - formações brancas F - inalteradas
5,0	0,0	1,0	E - inalteradas P - formações globulares F - inalteradas
5,0	0,0	5,0	E - inalteradas P - inalterados F - com calos bordas

5.7. Enraizamento

Conforme descrito na Tabela 13 no Histograma 4 o tratamento mais eficiente no enraizamento foi obtido quando os eixos caulinares foram inoculados em meio contendo IAA 1,0 mg/l sob efeito da luz, regenerando em média até 7,95 raízes por broto (figura 7). Este tratamento diferiu estatisticamente de todos os outros tratamentos realizados. Os tratamentos utilizando IAA 0,5 mg/l e M.S. sem fitoreguladores também foram eficientes regenerando 5,1 e 4,1 raízes/broto respectivamente. Os tratamentos utilizando IBA 3,0 mg/l e 5,0 mg/l regeneraram uma média de 2,5 raízes/broto, sendo portanto menos efetivos. Segundo a Tabela 13, também pode se observar que apenas nos tratamentos com IAA 0,5 e 1,0 mg/l houve diferenças estatísticas entre o número de raízes regeneradas sob o efeito da luz ou no escuro. Os demais resultados não diferiram estatisticamente. O quadro de análise de variância para formação de raízes esta representado no Anexo, Quadro 4.

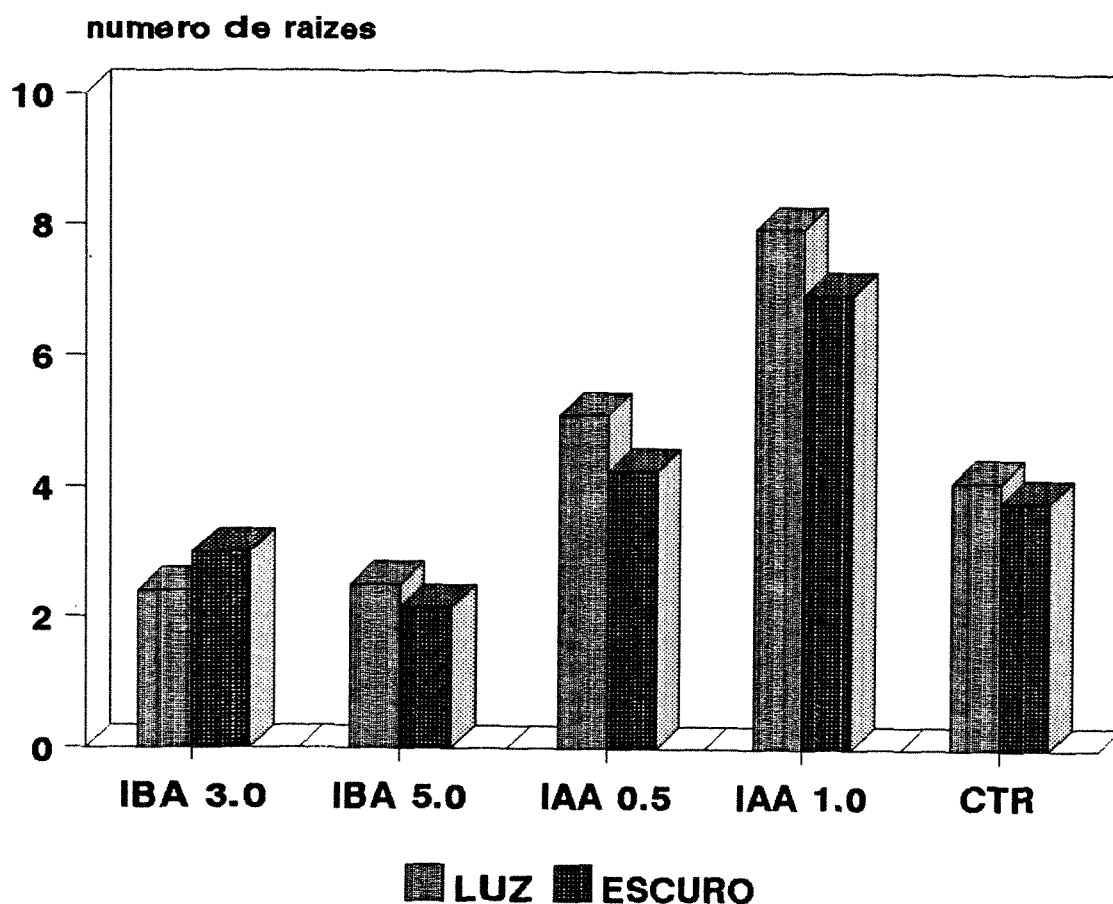
Em outros trabalhos realizados com arbóreas, é bastante clara a necessidade da utilização de IBA no processo de enraizamento. Espécies do gênero *Cannabis*, apenas enraizaram em meios de cultura acrescidos de IBA em baixas concentrações e na presença de carvão ativado (Dumanois *et al.*, 1986). Em *Malus*, James & Thurbon (1979), descrevem o enraizamento deste gênero apenas quando utilizaram IBA 2,0 mg/l combinado com floruglucinol 160,0 mg/l, com posterior transferência dos brotos para meio livre de fitoreguladores. Porém, Jones *et al.* (1977) já descrevem este enraizamento direto através do

TABELA 13 E HISTOGRAMA 4 - Efeito de diferentes tipos de combinações de fitoreguladores sob influência ou não da luz, sobre a formação de raízes em *C. glaziovii*. Dados obtidos 25 dias após a inoculação.

FITOREGULADORES (mg/l)	LUZ	ESCURO
IBA 3,0	2,4 d A	3,0 cd A
IBA 5,0	2,5 d A	2,15 d A
IAA 0,5	5,1 b A	4,25 b B
IAA 1,0	7,95 a A	6,95 a B
CTR (s/ fitoreguladores)	4,1 c A	3,8 bc A

dms : a,b... - 0,70
dms : A,B... - 0,98
C.V. : 27,03%

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Resultados obtidos pela média de 5 repetições.



cultivo de brotos em meio acrescido de IBA 1,0 mg/l. Estes resultados diferem dos obtidos para *C. glaziovii*, uma vez que os melhores resultados para este gênero foram obtidos utilizando IAA como fitoregulador, ao contrário de Sinska (1988), que descreve a ocorrência de enraizamento de *Malus* inoculando brotos em meio acrescido de IAA 10^{-5} M. Em outras arbóreas, como *Morus alba* L. e *M. bombycis* Koidz., o enraizamento foi realizado com IBA 5,0mg/l e NAA 0,1 mg/l respectivamente, sem necessidade de transferência dos brotos para outros tipos de meios (Kim *et al.*, 1985; Yakuwa & Oka, 1988). Interessante também é ressaltar a dificuldade encontrada no enraizamento de *Pirus calleryana* Decne., onde após 2 anos de subculturas intermitentes, não foi obtido enraizamento (Stimart Harbage., 1979). Em culturas de *Pirus communis*, o enraizamento se deu facilmente em meios de cultura acrescidos de IAA 2,0 mg/l obtendo 100% de enraizamento. Este dado foi o mais próximo ao obtido para *C. glaziovii*, porém foi utilizada concentração de IAA mais elevada.

A fim de comparar apenas o efeito da luminosidade no enraizamento de brotos de *C. glaziovii*, os dados de enraizamento foram agrupados apenas levando em consideração o fator luz. Segundo a tabela 14 e o Histograma 5, houve diferença estatística ao compararmos apenas os dados relativos a luminosidade. O tratamento no qual os brotos foram colocados sob a presença de luz responderam mais efetivamente na formação de raízes que no escuro. Estes dados são confirmados nos trabalhos de Sinska (1988); Yakuwa & Oka (1988)

e Baviera *et al.* (1989).

Por outro lado, quando excluímos o fator luz do tratamento, comparando apenas a eficiência do meios de cultura utilizados, notamos que o meio IAA 1,0 mg/l é realmente o meio mais eficiente na formação de raízes, seguido pelo meio IAA 0,5 mg/l, M.S. sem hormônio e os meios IBA 3,0 e 5,0 mg/l, os quais não foram muito efetivos, discordando de trabalhos já mencionados acima (Tabela 15 e Histograma 6).

5.8. Aclimação

As plantas enraizadas foram facilmente aclimatadas em copos de plástico contendo terra-vermiculita (3:1) sob umidade relativa de 100%. A umidade relativa do ar foi mantida em níveis altos pelo cultivo das plantas dentro de sacos de plástico umidificados uma vez ao dia. Duas semanas foram suficientes para a adaptação das plantas ao meio, sendo que os sacos plásticos foram sendo lentamente abertos a fim de evitar choques bruscos das plantas com o meio ambiente. A mistura da terra-vermiculita facilitou a penetração das raízes no substrato. Tentativas de se aclimatar mudas com terra sem vermiculita não apresentaram resultados satisfatórios, sendo que as raízes se apresentaram pequenas e túrgidas.

TABELA 14 e HISTOGRAMA 5 - Efeito da luz na formação de raízes de *C. glaziovii*, excluindo-se o fator tipo de fitoreguladores. Valores obtidos após 25 dias de cultura.

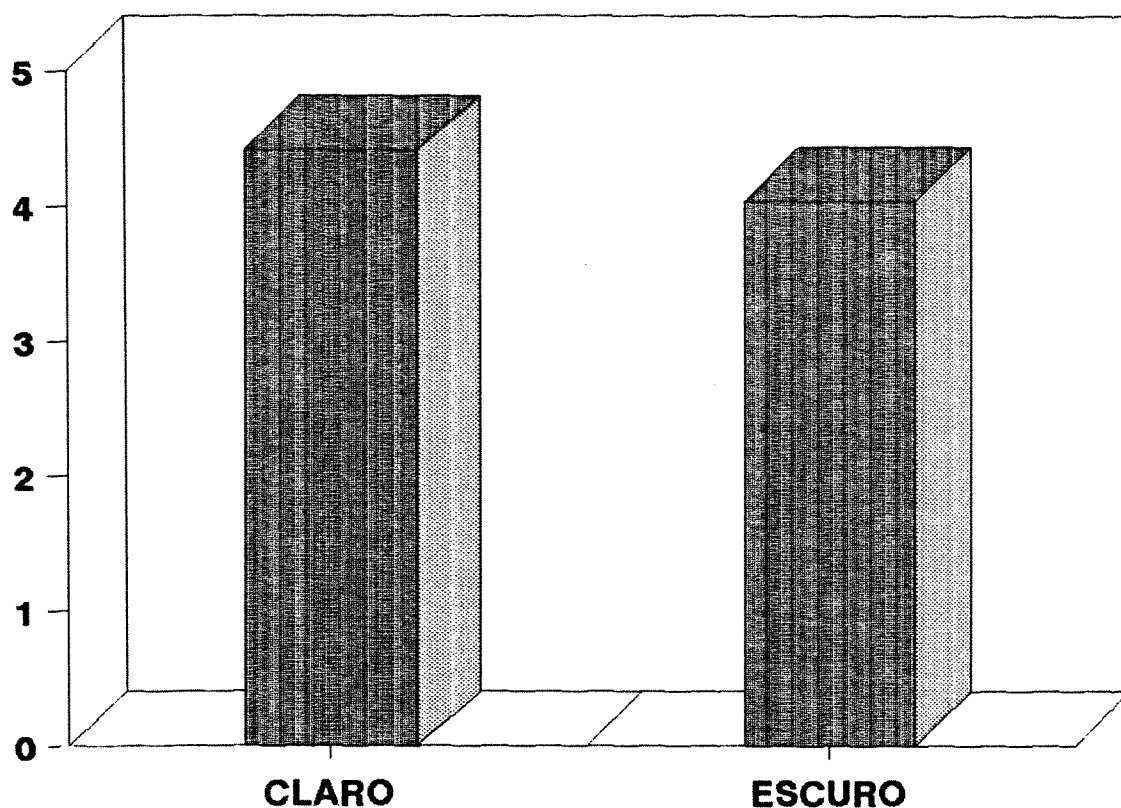
LUMINOSIDADE	NÚMERO DE RAÍZES
LUZ	4,41 a
ESCURO	4,03 b

dms : a,b... - 0,31

C.V. : 27,03%

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Resultados obtidos pela média de 20 repetições.

numero de raizes



Plantas transferidas assepticamente para frascos contendo terra vermiculita também se adaptaram satisfatoriamente quando retiradas as condições assépticas levando a possibilidade de também se utilizar este método de aclimação.

As plantas transferidas para o campo sobreviveram numa média de 90% sendo que os 10% de perda talvez possam ser atribuídas ao sistema radicular que provavelmente ainda não estava totalmente estabelecido (figura 8).

Até o momento, não foram observadas alterações fenotípicas nas plantas regeneradas e aclimatadas no campo. Este fato muitas vezes não ocorre em outras culturas, como no caso do milho (*Zea mays*) (Prioli, 1987 ; Earle, 1985) que devido a vários fatores como por exemplo o estresse ambiental, não apresentaram o seu fenótipo normal após a aclimação.

A metodologia desenvolvida neste trabalho, levou a possibilidade de clonar plantas de *C. glaziovii* que futuramente podem ser atribuídas como portadoras de altos teores de princípios ativos medicinais. A obtenção de calos friáveis, com provável uniformidade genética também leva a possibilidade futura do estabelecimento de culturas de células em suspensão e até produção de metabólitos de interesse em bioreatores.

TABELA 15 e HISTOGRAMA 6 - Efeito de diferentes tipos de fitoreguladores na formação de raízes de *C. glaziovii* excluindo -se o fator luminosidade. Dados obtidos após 25 dias de cultura.

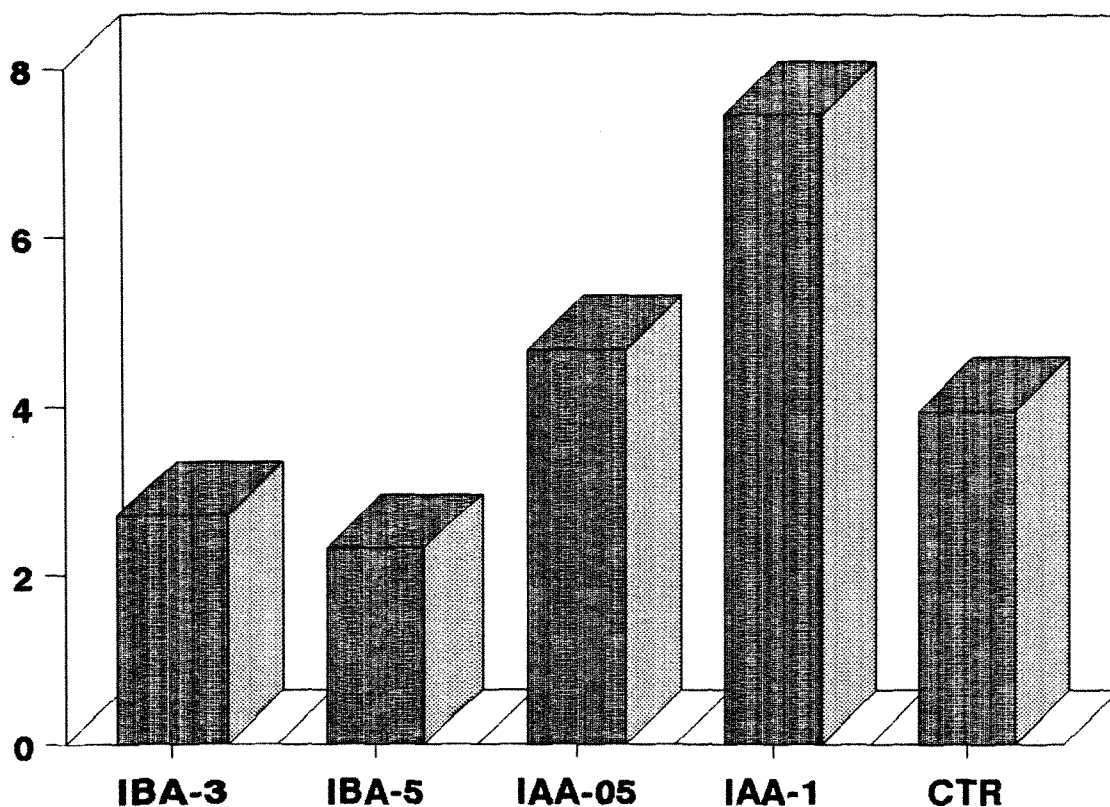
FITOREGULADORES (mg/l)	NÚMERO DE RAÍZES
IBA 3,0	2,71 d
IBA 5,0	2,32 d
IAA 0,5	4,67 b
IAA 1,0	7,45 a
CTR (s/ fitoreguladores)	3,95 c

dms : a,b... - 0,69

C.V. : 27,03%

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Resultados obtidos pela média de 40 repetições.

numero de raízes por broto



6 . CONCLUSÕES

1. Não houve necessidade de indução de juvenilidade nas plantas adultas de *C. glaziovii* para o estabelecimento de culturas de calos e micropropagação (característica pouco comum em lenhosas).

2. Foi possível obter alta taxa de multiplicação de *C. glaziovii* através de micropropagação sendo que a combinação de fitoreguladores BAP 10,0 mg/l + NAA 2,0 mg/l foi a mais produtiva. A utilização de BAP foi indispensável como fonte de citocininas nesta etapa.

3. Calos foram induzidos a partir de pecíolos, sendo que 2,4-D foi indispensável como fonte de auxinas. Tratamentos realizados no escuro resultaram em melhores níveis de crescimento de calos.

4. Plantas de *C. glaziovii* foram regeneradas a partir de calos através de morfogênese direta. As plantas regeneradas, foram transferidas para o campo, levando à possibilidade de avaliação da ocorrência de variação somaclonal. Não foi observada embriogênese somática nas condições experimentais realizadas.

5. A auxina IAA nas concentrações de 1,0 mg/l e 0,5 mg/l mostrou-se adequada para induzir enraizamento de plântulas de *C. glaziovii* regeneradas a partir de calos e micropropagação direta. Aparentemente a alta proliferação de raízes facilitou a aclimação das plântulas regeneradas e permitiu uma alta porcentagem de sobrevivência das plantas durante o processo de aclimação.

FIGURAS

Figura 1 - Esquema de obtenção de explantes (folhas, pecíolos e estípulas), a partir de plantas cultivadas em estufa e no campo.

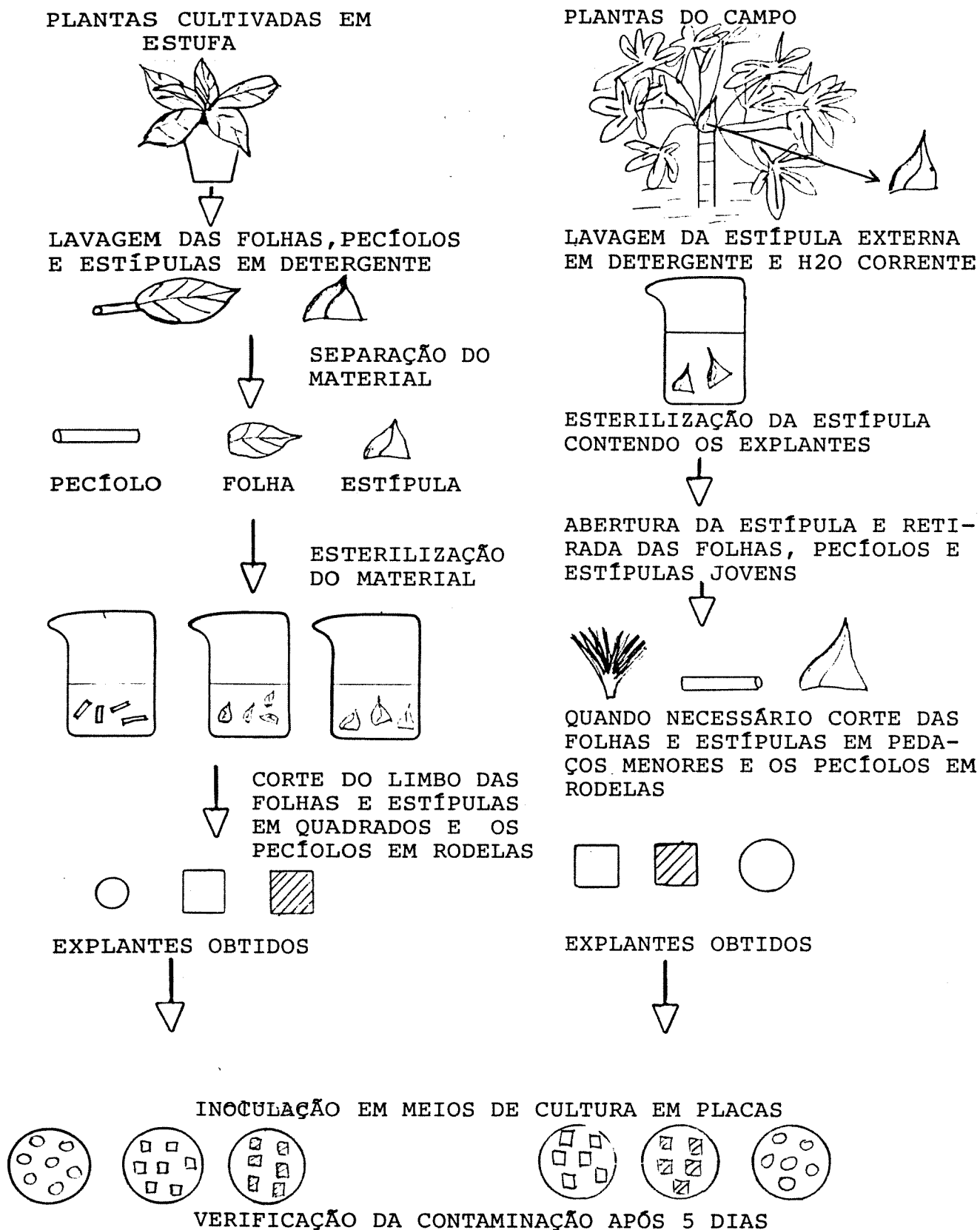


Figura 2 — Esquema de obtenção de explantes a partir de plantas obtidas pela germinação de sementes esterilizadas.

COLETA DAS SEMENTES NO CAMPO
(SERRA DO MAR - UBATUBA)

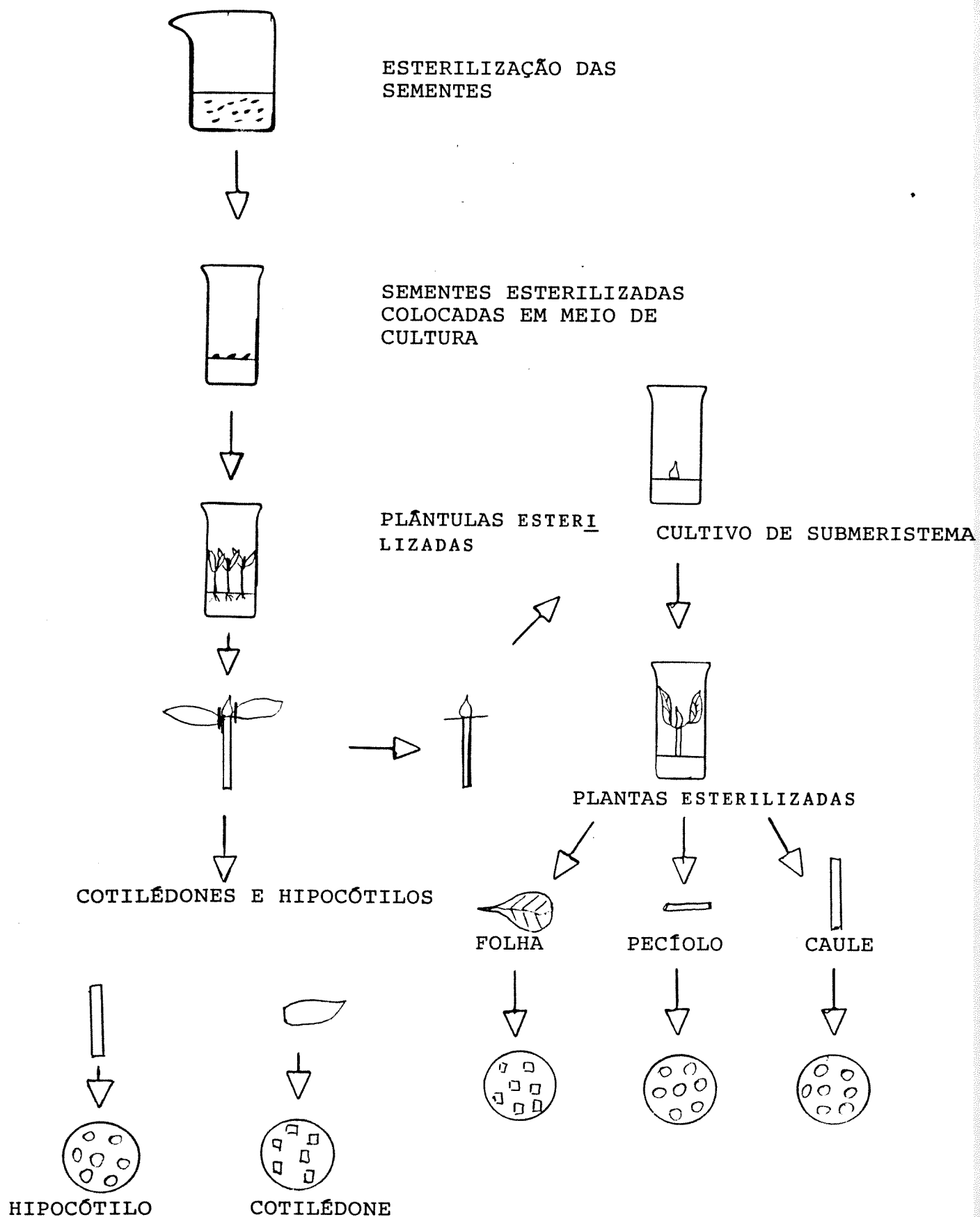




Figura 3 - Planta adulta de *C. glaziovii* com aproximadamente 3 anos. A seta indica a estípula terminal onde estão encerrados as folhas, pecíolos e estípulas internas.

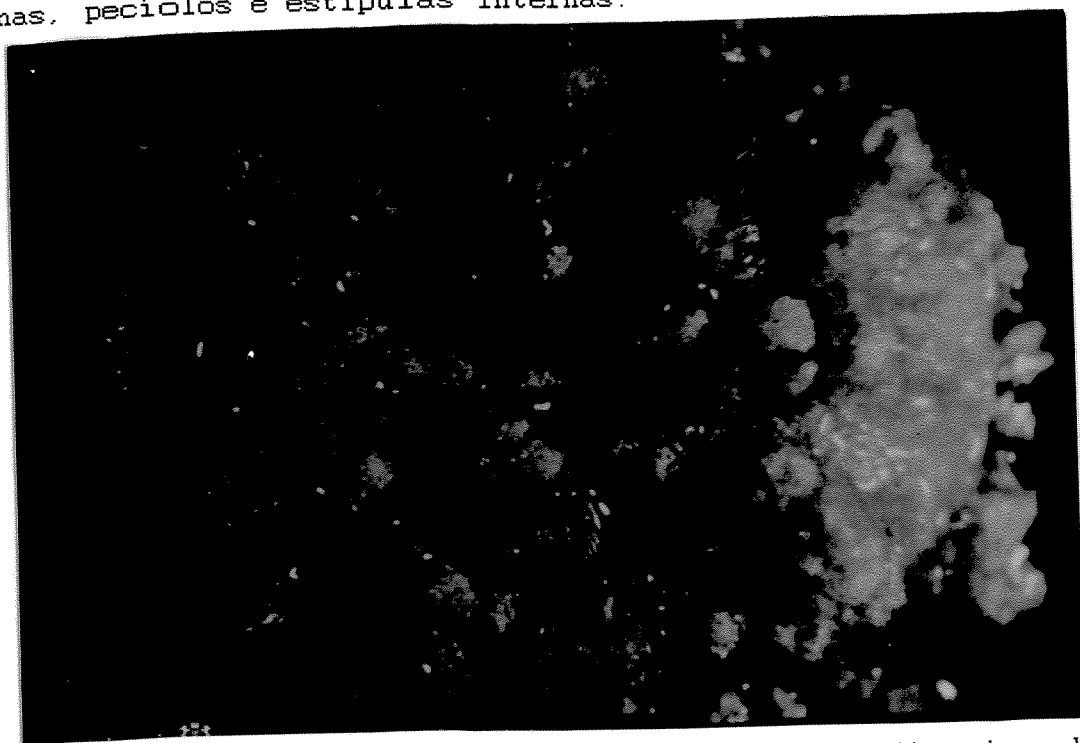


Figura 4 - Calo de *C. glaziovii* obtido após 30m dias de cultura de pecíolos em meio M.S. acrescido de 2,4-D 5.0 mg/l + BAP 1.0 mg/l.

Figura 5 - Regeneração de brotos de *C. glaziovii* a partir de calos provenientes de cultura de pecíolos. A) Cultura de 30 dias apresentando a formação de vários brotos a partir de calo friável. B) Detalhe de um broto de 35 dias regenerado a partir de calo friável. C) Formação de folhas a partir de calo de 50 dias de idade. Meio de cultura composto de M.S. acrescido de 2,4-D 10,0 mg/l.

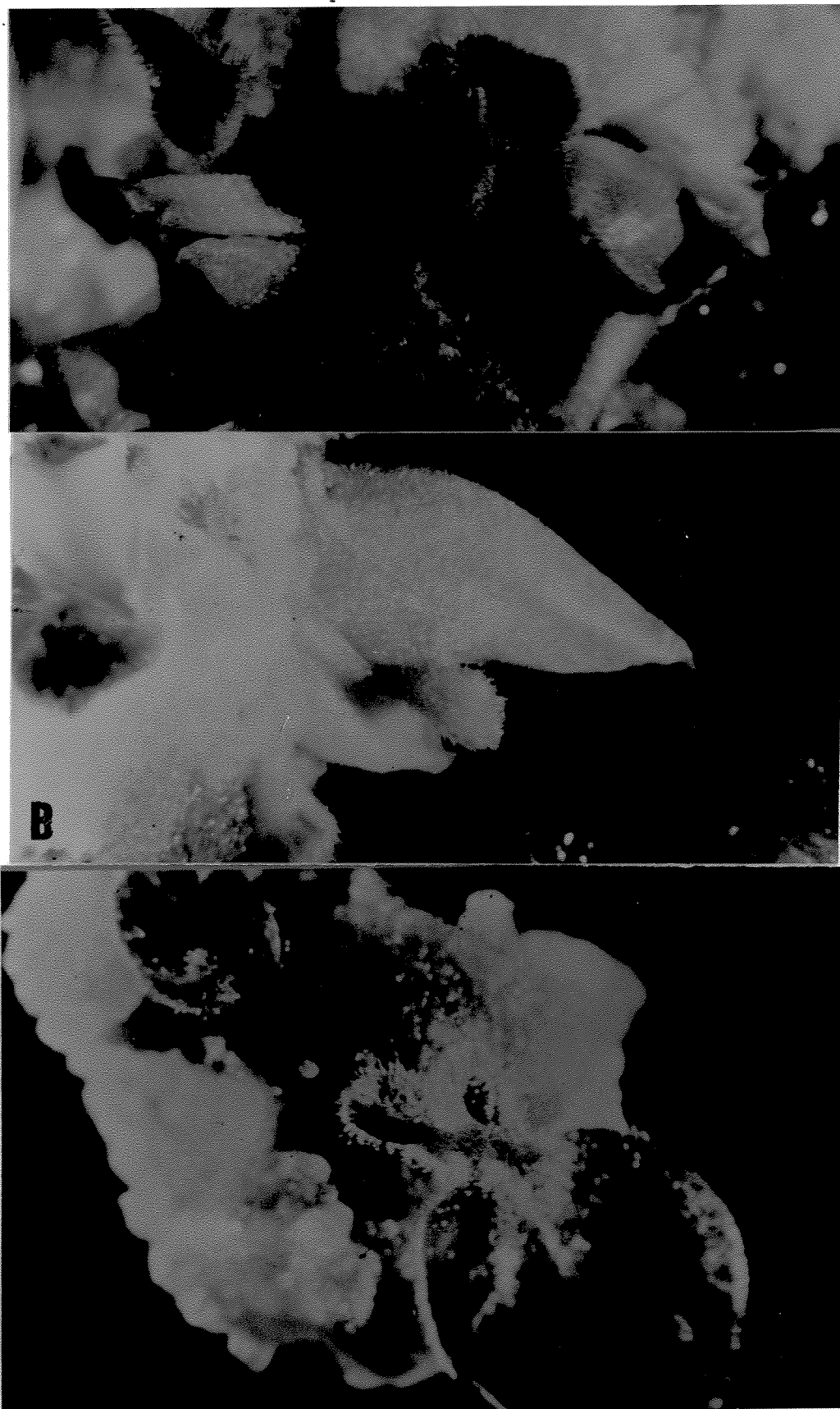


Figura 6 - Estruturas obtidas a partir de culturas de *C. glaziovii* após 25 dias de cultura. A) Formações globulares. B) Calo com aspecto cottonoso.

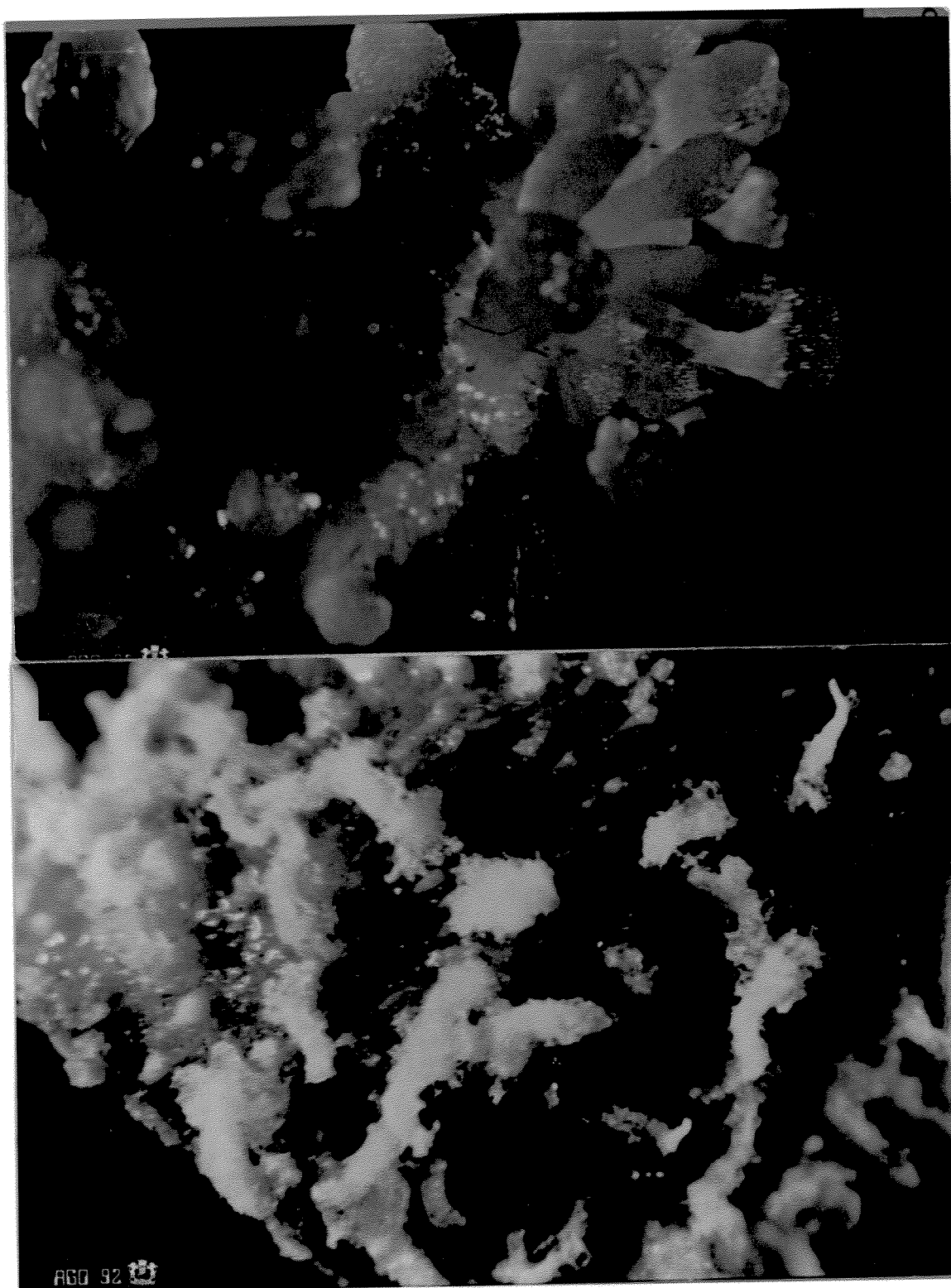




Figura 7 - Enraizamento de plântula de *C. glaziovii* com 50 dias de idade. Meio de cultura M.S. acrescido de IAA 1,0 mg/l.



Figura 8 - Plantas de *C. glaziovii* de 6 meses de idade obtidas por cultura de tecidos, aclimatadas no campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas da UNICAMP.

7. LITERATURA CITADA

- Andrade, J.C. - 1981 - Biologia *Cecropia lyratiloba* Miq. Var. Nana. Andr. & Car. (Moraceae) na restinga do Recreio dos Bandeirantes. Tese submetida a Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Balandrin, M.F. & J.A. Klocke -1985- Natural plant chemicals : Source of industrial and medicinal materials. Science , 228 : 1154-1160.
- Barroso, G.M. - 1978 - Urticales .In: Sistemática de Angiospermas no Brasil. R. de Janeiro e São Paulo. Vol 1: pp. 68-84.
- Baviera, J.A.; Garcia, J.; Ibarra, M. -1989- Commercial "in vitro" micropropagation of pear cv "Conference". Acta Horti., 256: 63-68.
- Bell, E.A.; Charlwood, B.V. (eds) - 1980 - Encyclopedia of Plant Physiology. Springer Verlag. N. York. 8 :1521p
- Ben-Hayyim, G. Neumann, H. - 1983- Stimulatory effect of glycerol on growth and somatic embryogenesis in *Citrus* callus cultures. Z. Pflanzenphysiol. 110 : 331-338.
- Berg, C.C. - 1978a - Cecropiaceae a new family of Urticales. Taxon. 27(1): 39-44.

Berg, C.C. - 1978b - Espécies de *Cecropia* da Amazônia Brasileira. *Acta Amaz.* 8(2): 149-182.

Biondi, S.; Thorpe, T.A. - 1982- Growth regulator effects, metabolite changes, and respiration during shoot initiation in cultured cotyledon explants of *Pinus radiata*. *Bot. Gaz.* 143: 20-25.

Bonga, J. M. - 1977 - Applications of tissue culture in forestry. *In* : J. Reinert, YPS Bajaj, eds. *Applied and Fundamental Aspects of Plant, Tissue, and Organ Culture*. Springer-Verlag, Berlin, pp 93-108.

Bonga, J.M. - 1981- Organogenesis "in vitro" of tissues from mature conifers. *In Vitro.* 17 : 511-518.

Bonga, J.M. -1982- Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. *In* :J.M. Bonga, D.J. Durzan, eds. *Tissue Culture in Forestry*. Martinus Nijhoff, Dr. W. Junk Publ., The Hague, pp 387-412

Borkowska, B. -1989- Comparative response of sour cherry cultures to different cytokinins. *Acta Hortic.* , 230: 109-112.

Bornman, C.H.; Jansson, E. -1981- Regeneration of plants from the conifer leaf: Limitations imposed by needle morphology. *In*: *Proc. IUFRO Sect. S2 01 5. Int. Workshop "In Vitro" Cultivation*

For Tree Species. Fontainebleau, France, pp 41-53.

Boulay, M. -1985- In: Proc. Int. Symp. on "in vitro" propagation of forest tree species. Bologna. pp. 51-81.

Buerger, W. - 1977 - Moraceae. In: Burger, Flora Costaricensis, Fieldiana. Bot. *Cecropia*, 40: 122-127.

Button, J. -1978- The effects of some carbohidratres on the growth and organization of *Citrus* ovular callus: Z. Pflanzenphysiol. 88: 61-68.

Carauta, J.P. - 1980 - Moraceae. Notas Taxonômicas. Rodriguésia 53: 109-116.

Carlini, E.L.A. - 1988 - Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: (*Maytenus ilicifolia* "Espinheira Santa" e outras). Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais (CEME), 2: 2

Chapula, D. -1977- Development of isolated Norway spruce and Douglas fir buds "in vitro". Commun. Inst. For. Cech., 10: 71-78.

Cheng, T.Y. -1975- Adventitious bud formation in cultures of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). Plant. Sci. Lett., 5: 97-102.

- Cheng, T.Y. -1976- Vegetative propagation of western hemlock (*Tsuga heterophylla*) through tissue culture. Plant Cell Physiol., 17: 1347-1350.
- Cheng, T. Y. -1977- Factors affecting adventitious bud formation of cotyledon culture of Douglas fir. Plant. Sci. Lett., 9: 179-187.
- Cheng, T.Y.; Voqui, T.H. - 1977 - Regeneration of Douglas-fir plantlets through tissue culture. Science , 198: 306-307.
- Conceição, M. - 1982 - As Plantas Medicinais no ano 2000. Tao Editora Ltda., São Paulo.
- Corner, E.J.H. - 1962 - The classification of Moraceae. Card. Bull. Singapore , 19: 187-252.
- Corrêa, M.P. - 1923 - As Plantas úteis - a Imbaúba, *Cecropia pachystachya*. Chácaras e Quintais.
- Costa, A.F. -1964- Farmacognosia. Fund. Calouste Gulbenkian, Lisboa, Vol. 2: 1038.
- Costabel, F.- 1990 - Medicinal plant biotechnology. Planta Médica , 56 : 421-425

- Cruz, G.L. - 1965 - Livro verde das Plantas Medicinais e Industriais do Brasil. S(Umbaúba: 805). B.H. 863p
- Cruz, G.L. - 1979 - Imbaíba, Dicionário das Plantas úteis do Brasil, Ed. Civilização Brasileira S.A., Rio de Janeiro, 251-252.
- David, H.; Isemukali, K; David, A. - 1978- Obtention de plants de Pin maritime (*Pinus pinaster* Sol.) a partir de brachyblastes ou d'apex caulinaires de tres jeuns sujets cultivés "in vitro". CR Acad. Sci. , 287: 245-248.
- Davies, F.T. -1984- Shoot RNA, cambial activity and indolebutiric acid effectivity in seasonal rooting of juvenile and mature *Ficus pumila* cuttings. *Physiol. Plant.* , 62 : 571-575.
- Debruijne, E.; Delanghe, E.; Van Rijk, R. -1974- Action of hormones and embryoid formation in callus cultures of *Carica papaya*. Meded Fac. Landbouwet Rijksumiv Ghent, 39: 637-645.
- Della Monache, F.; Giacomozzi, C.A.; Calixto, J.B.; Yunes, R.A. - 1988- Isolamento e identificação da isovitexin obtida de frações farmacologicamente ativas da *Cecropia glaziovii*. Anais do X Congresso de Plantas Medicinais de São Paulo. Res. 6.
- DiCosmo, F. & M.Misawa - 1985 - Eliciting secondary metabolism in the plant cell.. *Trends Biotechnol.* 3 : 318-320

- Dumanois, R.; Boucher, B.; Cosson, I.; Paris, M. -1986- Multiplication végétative "in vitro" du chavre (*Cannabis sativa* L.). Application à la conservation des clones sélectionnés. *Agronomie*, 6 (5) : 487-495.
- Durzan, D.J. - 1984- Special problems: adult vs juvenile explants. In W.R. Sharp, D.A. Evans, P.V. Amirato, Y. Yamada, *Handbook of Plant Cell Culture*. MacMillan, New York, 2 pp 471-500.
- Earle, D.E.; Gracen, V.E. -1985- Somaclonal variation in progeny of plants from tissue cultures. *In* : *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*. (R.R. Henke *et al.* eds), Plenum Press, N. York, pp 139 - 152.
- Eliert, V.; W. G. W. Kurz and F. Costabel - 1987- Alkaloid accumulation in Plant cell cultures upon treatment with elicitor. *In* Costabel, F. and Vasil, I.K. ed. *Plant Tissue and Cell Culture*. Allan R. Liss Inc. pp 213-219.
- Engler, E.H.A.- 1889- Ulmaceae, Moraceae und Urticaceae. *In*: Engler & Prantl, *Die Natürlichen Pflanzenfamilien* Leipzig, ed., Vol 3 (1): pp 59-118.
- Ericksen, E.N.; Mohamed, S. -1974- Root formation in pea cuttings. II. The influence of indole-3-acetic acid at different developmental stages. *Physiol. Plant*, 30 : 158-162.

- Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Medina, U.P. - 1984 - Somaclonal and gametoclonal variation. *Amer. J. Bot.*, 71 : 759-774
- Fabijan, D.; Taylor, J.S.; Reid, D.M. - 1981 - Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. II. Action of gibberellins, cytokinins, auxins and ethylene. *Physiol. Plant.*, 53 : 589-597.
- Favre, J.M. -1977- La Rhizogenese. Aspects divers d'un processus d'organogenese vegetale. *Ann Univ. Abidjan, Ser. C. Sci.*, 15: 175-178
- Fonseca, E.T. da - 1935 - Umbaúba - *Rev. Fl. Med.*, 11(6): 289-296.
- Fonseca, E.T. da - 1940 - Plantas medicinais brasileiras. *Rev. Fl. Med.*, 6(4): 228-230.
- Fowler, M.H. -1986- Process strategies for plant cell. *Trends Biotechnology*, 4: 214-219
- Franclet, A. -1983 - Rajeunissement, culture "in vitro" et pratique sylvicole. *Bull. Soc. Bot. Fr., Actual Bot.* 130 : 87-101.
- Franclet, A. -1987- In: Bonga, J.M.; Durzan, D.J. (eds). Cell and tissue culture in forestry Vol 1: General Principles and Biotechnology. California. pp 232-248.

- Fransworth, N.R. - 1977 - In: Seigler, D.S. ed. Crop resources. Acad. Press. N. York, pp 61-73.
- Fransworth, N.R.; Bingel, A.S. - 1977 - In. Wagner, A.; Wolff (eds) - New natural products and plant drugs with pharmaceutical biological activity. Springer Verlag N. York. pp: 1-22.
- Fujita, Y. - 1988 - In. Yamada, Y. (ed.), Ciba Foundation Symposium 137, pp. 228-238.
- Fujita, Y.; S. Takahashi; Y Yamada - 1985 - Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives by protoplast culture of *Lithospermum erythrorhizon* cells. Agric. Biol.Chem., 49: 1755-1759.
- Gamborg, O.L.; Miller, R.A.; Ojima, K. -1968- Nutrient requirements of suspension cultures of soybeans root cells. Experimental Cell Research 50: 151-158.
- Gaspar, Th.; Smith, D.; Thorpe, T. -1977- Arguments supplementaires en faveur d une variation inverse du niveau auxinique endogene au cours des deux premieres phases de la rhizogenese. C.R.Acad. Sci. (Paris), 285 : 327-330.
- Gaspar, Th -1981- Rooting and flowering, two antagonistic phenomena from a hormonal point of view. In B. Jeffcoat, ed, Aspects and

Prospects of Plant Growth Regulators. Brit. Plant Growth Regulat Group, Wantage, pp 39-49.

Gautheret, R. J. - 1985 - History of plant tissue and cell culture: a personal account. In Vasil, I.K. ed. Cell culture and Somatic Cell Genetics of Plants Vol. 2 Academic Press, New York. 2 - 59.

Geneve, R.L.; Heuser, C.W. -1982- The effect of IAA, IBA, NAA and 2,4-D on root promotion and ethylene evolution in *Vigna radiata* cuttings. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 107 : 202-205.

Gomes, F.P. -1982- O teste de Tukey. In: Curso Experimental de Estatística, Ed. Nobel, S.P., p.38-41

Gupta, P.K.; Durzan, D.J. -1985- Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*Pseudotsuga menziessii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Rep. 4 : 177-179

Gurumurti, K.; Gupta, B.B.; Kumar, A. -1984- Hormonal regulation of root formation. In: S.S. Purohit, ed, Hormonal Regulation of Plant Growth and Development. Agro Bot. Publ., India, Vol 1 : pp 387-400.

Haccius, B. - 1978- Question of unicelullular origin on non-zigotic embryos in callus cultures. Phytomorphology, 28: 74-81

- Haissig, B.E. -1972- Meristematic activity during adventitious root primordium development. *Plant Physiol.* 49 : 886-892.
- Haissig, B. E. -1974- Origins of adventitious roots. *N.Z. J. Sci.* 4 : 299-310.
- Haissig, B.E. -1984- Carbohydrate accumulation and partitioning in *Pinus banksiana* seedling and seedling cuttings. *Physiol. Plant.*, 61 : 13-19.
- Haissig, B.E. -1985- Metabolic processes in adventitious rooting. In M.B. Jackson, ed. *New Root Formation. In: Plants and Cuttings.* Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publ., The Hague, In press.
- Hammerschlag, F. -1982- Factors affecting establishment and growth of peach shoots "in vitro". *Hortic. Sci.* 17(1): 85-86.
- Hammerschlag, F.A.; Baughan, G.; Scorza, R. -1985- Regeneration of peach plants from callus derived from immature embryos. *Theor Appl. Genet.* 70: 248-251.
- Hansen, J. -1976- Adventitious root formation induced by gibberellic acid and regulated by the irradiance of the stock plants. *Physiol. Plant.* 36 : 77-81.
- Harborne, J.B. - 1972 - *Phytochemical ecology.* Acad. Press, N.York., 571p

- Harborne, J.B. - 1978 - Biochemical aspects of plant and animal coevolution. Acad. Press, N. York., 389p
- Harborne, J.B. - 1982 - Introduction to ecological biochemistry Ed/2 Acad. Press, N. York., 670p
- Harney, P.M. - 1982 - Tissue Culture Propagation of some Herbaceous Horticultural Plants. In: Tomes, D.T.; Ellis, B.E.; Harney, B.M.; Kassha, K.J.; Peterson, R.L.(eds). Application of plants cell and tissue culture to agriculture and industry. Univ. Guelph. pp 187-208.
- Hauman, L. - 1948 - Moraceae. In: Flore du Congo Belge et du Ruanda Urundi. Spermatophytes, Bruxelles. Vol 1: 52-97. .
- Hedin, P.A. - 1983 - Plant resistance to insects. Am. Chem. Soc. Washington D.C., 4: 27-35.
- Hirschorn, H.H. - 1981 - Botanical remedies of South and Central America and the Caribbean: An archival analysis part I. J. Ethnopharmacol., 4: 129-158.
- Huxter, T.J.; Thorpe, T.A.; Reid, D.M. -1981- Shoot initiation in light- and dark- grown tobacco callus : the role of ethylene. Physiol. Plant., 53 : 319-326.

- Ikeda, K.; D.Teshima; T.Aoyama; M.Satake;; K. Shimomura - 1988 - Clonal Propagation of *Cephaelis ipecacuanha*. Plant Cell Rep., 7: 288-291.
- Illg, R.D. - 1991 - Plant tissue culture techniques. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 86 (2): 21-24
- James, D.J.; Passey, A.J.; Rugini, E. -1988- Factors affecting high frequency plant regeneration from apple leaf tissues cultured "in vitro". J. Plant Physiol., 132: 148-154.
- James, D.J.; Thurbon, I.J. -1979- Rapid "in vitro" rooting of the apple rootstock M.9- J. Hort. Sci., 54(4) :309-311.
- James, D.J.; Passey, A.J.; Deeming, C. -1984- Adventitious embryogenesis and the "in vitro" culture of apple seed parts. J. Plant Physiol. 115 : 217-229.
- Jarvis , B.C. -1985- Endogenous control of adventitious rooting in non-woody cuttings. In: M.B. Jackson, ed. New Root Formation in Plants and Cuttings. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publ., The Hague. In press.
- Jarvis, B.C. Ali, A.H.N.; Shaheed, A.I. -1983- Auxin and boron in relation to the rooting response and ageing of mung bean cuttings. New Phytol., 95 : 509-518.

- Jones, O.P.; Margaret, E.; O'Farrell, D. -1977- Propagation "in vitro" of M.26 apple rootstocks. J. Hort. Sci., 52: 235-238.
- Kantharay, G.R.; Mahadevan, S.; Padmanaban, G. -1979- Early biochemical events during adventitious root initiation in the hypocotyl of *Phaseolus vulgaris*. Phytochemistry, 18 : 383-387.
- Kim, H.R.; Kamlesh, R.P.; Thorpe, T.A. -1985- Regeneration of mulberry plantlets through tissue culture. Bot. Gaz., 146(3) : 335-340.
- Kochba, J.; Button, J. -1974- The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habilitated ovular callus from the Shamouti orange (*Citrus sinensis*) as affected by tissue age and sucrose concentration. Z. Pflanzenphysiol., 73 : 415-21.
- Kochba, J.; Spiegel-Roy, P.; Saad, S.; Neumann, H. -1978a- Stimulation of embryogenesis in *Citrus* tissue culture by galactose. Naturwissenschaften, 65 : 261.
- Kochba, J.; Spiegel-Roy, P.; Saad, S.; Neumann, H. - 1978b- Tissue culture studies with *Citrus*: 1) The effect of several sugars on embryogenesis and 2) application of *Citrus* tissue cultures for selection of mutants. In: A.W. Alfermann, E. Reinhard, eds, Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods. Proc. Int. Symp Plant Tissue Cult, Munchen, pp 223-233.

- Kochba, J.; Spiegel-Roy, P.; Neumann, H.; Saad, S. -1978-
Stimulation of embryogenesis in *Citrus* ovular callus by ABA,
ethephon, CCC and Alar and its suppression by GA. Z.
Pflanzenphysiol., 89 : 427-432.
- Kochba, J.; Spiegel-Roy, P.; Neumann, H.; Saad, S. -1982- Effect of
carbohydrate on somatic embryogenesis in subcultured nucelar
callus of *Citrus* cultivars. Z. Pflanzenphysiol., 105 : 358-368
- Kohlenback, H.W. - 1978 - Comparative somatic embryogenesis. In: TA
Thorpe, ed, Frontiers of Plant Tissue Culture . Int Assoc. Plant
Tissue Culture, Univ. Calgary, pp 59-66.
- Konar, R.N.; Oberoi Y.P. -1965- "In vitro" development of embryoids
on the cotyledons of *Biota orientalis*. Phytomorphology , 15:
137-140.
- Kong, L.S.; Rao, A.N. -1981- Induction of callus and organogenesis in
Cocoa tissues. In: Rao, A.N., ed, Tissue Culture of Economically
Important Plants. COSTED and ANDS, Singapore, pp 107-112.
- Kononowicz, A.K.; Janick, J.-1984- The influence of carbon on the
growth and development of asexual embryos of *Theobroma cacao*.
Physiol. Plant., 61 : 155-162.
- Kreis, W. & Reinhard -1989- The production of secondary metabolites
by plant cell cultivated in bioreactors. Planta Méd, 55 : 409-415.

- Laimer, M.; Machado, A.C.; Hanzer, V.; Mattanovich, D.; Himmler, G.; Katingerm H.W.D. -1988- Regeneration of shoots from leaf discs and stem microcuttings of fruit trees as a tool for transformation. *Acta Hortic.* 235: 85-92.
- Larkin, P.J.; Scowcroft, W. R. - 1981 - Somaclonal variation : a source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 60 : 167
- LaRue, C.D. - 1954 - Studies on growth and regeneration in gametophytes and sporophytes of gymnosperms. *Brookhaven Symp. Biol* 6 : 187-208
- Leblay, C.; Chevresu, E.; Raboin, L.M. -1991- Adventitious shoot regeneration from "in vitro" leaves of several pear cultivars (*Pirus communis* L.). *Plant Cell Tiss and Org Cult.* 25: 99-105.
- Link, J.H.F. - 1831 - Moriformes In: *Handbuch zur Erkennung der nutzabarsten und am haufigsten vorkommenden Gewachse*, Berlin. Vol 2 : p.444
- Linsmaier, E. M.; Skoog, F. -1965 - Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 18 : 100-127.
- Loureiro, A.A.; Silva, M.F. da - 1968 - Catálogo das Madeira da Amazônia. SADAM, Belém. 411p

- Marques, I. & Brodelius, P. -1988- Elicitor-induced L tyrosine decarboxylase from plant cell suspension. *Plant Physiol.* 88 : 22-52.
- Mann, J. - 1978 - Secondary metabolism. Oxford Univ. Press. Oxford., 1069p
- Margara, J. -1982- In: Margara, J.,ed. Bases de la multiplication végétative. Les Méristemes et l'organogenese , INRA, Paris. pp. 160-163
- Matta, A.A. da - 1913 - Flora Médica Brasiliense - Ed. Obras da Imprensa Oficial, Rio de Janeiro. Imbaúba: 130-133 .
- Mainwald, J.; Prestwitch, G.D.; Nakamishi, K.; Kubo, SI. - 1978 *Science*, 199: 1167.
- Miguel, F.A.G. - 1853 - Urticinae. In: Martius,ed. Flora Brasiliensis , 4(1): 139-154
- Misawa, M. -1985- Production of useful compounds. *Advanced Biochemistry Engineer* 31: 58-88.
- Moreira, I.F. - 1978 - As Plantas Que Curam - Hemus Liv. Ed. Ltda, São Paulo, 758p.

- Mullins, M.J.; C. Srinivasan -1976- Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv Cabernet Sauvignon) by apomixis "in vitro". J. Exp. Bot., 27: 1022-1030.
- Murashige, T. - 1974 - Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Pl. Physiol., 25: 135-166.
- Murashige, T. 1978 - In: Thorpe, T.A. (ed) - Frontiers of Plant Tissue Culture. Univ. Calgary Press. Calgary, Canada. pp 15-26; 518-524
- Murashige, T.; Skoog, F. -1962- A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15:473-97.
- Narayan, P.; Jaiswal, V.S. -1986- Differentiation of plantlets from leaf callus of *Ficus religiosa* L. Indian J Exp. Biol., 24: 193-194.
- Nowgarede, A.; Rondet, P. - 1983 - Bases cytophysiologiques de l'induction rhizogene en réponse a un traitement auxinique dans l'pecotyle du Pois nain. Ann.Sci. Nat. Bot. Paris, 13e ser 5 : 121-149.
- Norstog, K. -1965- Induction of apogamy in megagametophytes of *Zamia integrifolia*. Am. J. Bot., 52 : 993-999.

- Ooishi, A.; Machida, H.; Hosoi, T.; Komatsu, H. - 1978- Root formation and respiration of the cuttings under different temperatures. J. Jap. Soc. Hortic. Sci., 47 : 243-247.
- Paiva, M.; Janick, J.-1983- "In vivo" and "in vitro" production of alkaloids in *Theobroma cacao* L. Acta Hortic., 131 : 265-273.
- Perne, V.C.; Hasegawa, P.M.; Janick, J. - 1981a - Sucrose mediated regulation of fatty acid composition in asexual embryos of *Theobroma cacao*. Physiol. Plant., 53 : 378-384.
- Perne, V.C.; Hasegawa, P.M.; Janick, J. -1981b- "In vitro" cotyledonary development and anthocyanin synthesis in zygotic and asexual embryos of *Theobroma cacao* L. J. Am. Soc. Horticul. Sci., 106 : 381-385.
- Pieterse, R.E. - 1989 - Regeneration of plants from callus and embryos of "Royal" apricot. Plant Cell, Tiss Org Cult., 19: 175-179.
- Pierik, R.L.M. -1990- Rejuvenation and Micropropagation. Newsletter, International association for plant tissue culture, 62: 11-21.
- Predieri, S.; Malavasi, F.F.F.; Passey, A.J.; Ridout, M.S.; James, D.J. -1989- Regeneration from "in vitro" leaves of "Conference" and other pear cultivars (*Pirus communis* L.) J. Hort Sci., 64(5) : 553-559.

- Prioli, L.M. -1987- Cultura de tecido e células, controle genético da embriogênese somática e variação somaclonal em milho (*Zea mays*). Campinas, Tese (Doutor em Ciências- Área de Genética Vegetal)- Inst. de Biologia- Universidade de Campinas.
- Putnam, A.R. - 1983 - Chem. Eng. News . 61 (n-14): 34.
- Radojevic, L. -1979- Somatic embryogenesis and plantlets from callus cultures of *Paulownia tomentosa* Stued. Z. Pflanzenphysiol., 91 : 57-62.
- Rice, E.L. - 1984 - Allelopathy (eds). Acad. Press, New York, 894p.
- Ribeiro, O.; Mors, W.B. - 1948 - Estudo químico da mucilagem das estípulas da imbaúba *Cecropia adenopus* Mart. Bolet Inst. Quím. Agric., 2: 1-21.
- Rosenthal, G.A.; Janzen, D.H. - 1979 - (eds) - Herbivores - Their interaction with secondary plant metabolites. Acad. Press, N. York, 389p.
- Sandberg, F.; Bruhn, J.G. - 1972 - Bot. Not., 125: 370.
- Saules, C. L. de - 1948 - Considerações sobre a ambayba e sua aplicação à cura do Cancro. Rev. Flora Med., 10: 412-420.

- Sharp, R.; De Evans; P.V. Ammirato; Y. Yamada -1984- Handbook of Plant Cell Culture, MacMillan, New York. Vol. 2, 644p.
- Silva, J.R.M. de - 1951 - O Brasil e suas possibilidades - *Cecropia* Gráfica Tupy Ltda. Rio de Janeiro. p 174.
- Sinnott, E.W. - 1960- Plant Morphogenesis. McGraw Hill, New York, 377p
- Sinska, I. -1988- Callus formation and plant regeneration capacity of apple embryonic axes and cotyledons in relation to seed dormancy. Plant Sci., 54: 147-152.
- Sommer, H.E.; Brown, C.L.; Kormanik, P.P.- 1975 - Differentiation of plantlets in long leaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured "in vitro". Bot. Gaz., 136: 196-200.
- Sondahl, M.R.; Sharp, W.R. -1979- Research in *Coffea* and applications of tissue culture methods. In: W.R.Sharp, P.O.Larsen, E.F.Paddock, V. Raghavan, (eds) Plant Cell and Tissue Culture, Principles and Application. Ohio State Univ. Press, Columbus, pp 527-584.
- Spiegel-Roy, P; Kochba, J. - 1973- Stimulation of differentiation in orange (*Citrus sinensis*) ovular callus in relation to irradiation of the media. Rad. Bot., 13 :97-103.

- Stimart, D.P.; Harbagg, J.F. -1989- "In vitro" shoot proliferation of *Pirus calleryana* from vegetative buds. Hort. Sci., 24(2): 298-299.
- Street, H.E. - 1977 - In: Reiner, J.; Bajaj, Y.P.S. (eds) Plant cell tissue and organ culture. Springer Verlag. New York. p 649-667.
- Tisserat, B.; Murashige, T. - 1977a - Effects of ethephon, ethylene and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid on asexual embryogenesis "in vitro". Plant Physiol., 60 : 437-439.
- Tisserat, B.; Murashige, T. -1977b- Probable identity of substances in *Citrus* that repress asexual embryogenesis. In Vitro. 13 : 785-789.
- Tisserat, B.; Da Demason -1980- A histological study of development of adventive embryos in organ cultures of *Phoenix dactilyfera* L. Ann. Bot., 46 : 465-472.
- Vasil, F.K.; Vasil, V. - 1980 - Int. Rev. Cytol. (Suppl.) 121A: 145-173.
- Veierskov, B. Andersen, A.S. - 1982- Dynamics of extractable carbohydrates in *Pisum sativum*. III. The effect of IAA and temperature on content and translocation of carbohydrates in pea cuttings during rooting. Physiol. Plant., 55 : 179-182.

- Wallace, J.W.; Mansell, M.L. (eds) - 1976 - Biochemical interactions between plants and insects. In :Recent Advances in Phytochemistry, Plenum Press, New York. Vol 10: 785-894.
- Weigel, U.; Horn, W.; Hock, B. - 1984 - Endogenous auxin levels in terminal stem cuttings of *Chrysanthemum morifolium* during adventitious rooting. *Physiol. Plant.*, 61 : 422-428.
- Welander, M. -1988- Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised "in vitro" from apple trees. *J. Plant Physiol.*, 132: 738-744.
- Went, F.W. -1939- The dual effect of auxin on root formation. *Am. J. Bot.*, 26 : 24-29.
- Winton, L.L.- 1972- Callus and cell cultures of Douglas fir. *For. Sci.*, 18: 151-154.
- Winton, L.L.; Verhagen, S.A. -1977- Shoots from Douglas fir culture. *Can. J. Bot.*, 55: 1246-1250.
- Yakuwa, H.; Oka, S. -1988- Plant regeneration through meristem culture from vegetative buds of mulberry (*Morus bombyces*) Koidz. stored in liquid nitrogen. *Ann. Bot.* 62 : 79-82.

- Yamada, Y.; Hashimoto, T. - 1990 - Possibilities for improving yields of secondary metabolites in plant cell cultures. In: Nykamp, H.J.J. *et al.* (eds.) Progress in Plant Cellular and Molecular Biology, Holand, pp 547-556.
- Yeoman, M.M.; Meeddzyabrodska, M.B.; Lindsay, K.Mc.; Laughlam, W.R. -1980- In : Sala, F. Parisi; B. Cela Ciferi O. (eds). Plant cell cultures, results and perspectives. Elsevier. New York, 1272p.
- Zenk, M.H; El-Shagi, H.; Arens, H.; Stockigt, I. Weiler, W. -1977- Formation of indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell culture of *Catharanthus roseus*. In: Barz, W.; Reinhard, E.; Zenk, M.H. ed. Plant Tissue Culture and its Biotechnical Applications. Berlin, Springer Verlag, pp 27-43.
- Zonta, E.P.; Machado, A.A. -1992- Sanest2, Sistema de análise estatística para microcomputadores, SEI, 066060.

ANEXO

QUADRO 1 - Quadro de análise de variância obtido para formação de brotos de *C. glaziovii* a partir de brotos apicais e laterais inoculados em diferentes meios de cultura.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob. > F
MEIOS	14	4649,7466	332,1247	177,9909	0,00001
RESÍDUO	285	531,8000	1,8659		
TOTAL	299	5181,5466			

Média geral - 5,1866

Coeficiente de variação - 26,337%

QUADRO 2 - Quadro de análise de variância obtido para formação de calos de *C. glaziovii* através da interação de 3 fatores (meios, explantes e luminosidade).

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob. > F
MEIOS	8	8,37925	1,04740	16,2763	0,00002
EXPLANTE	2	3,87703	1,93851	30,1237	0,00003
LUZ	1	11,38962	11,38962	176,9899	0,00001
MEIO x EXPL	16	4,36296	0,27268	4,2374	0,00348
MEIO x LUZ	8	1,35703	0,16962	2,6360	0,04688
EXPL x LUZ	2	0,62370	0,31185	4,8460	0,02216
RESÍDUO	16	1,02962	0,06435		
TOTAL	53	31,01925			

Média geral - 1,696296

Coeficiente de variação - 14,955%

QUADRO 3 - Quadro de análise de variância obtido para formação de brotos de *C. glaziovii* a partir de calos. Os dados foram obtidos levando-se em conta o fator meio de cultura utilizado.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob. > F
MEIOS	11	819,6611	74,51464	46,0238	0,00001
RESÍDUO	168	272,0000	1,61904		
TOTAL	179	1091,6611			

Média Geral - 2,722

Coefficiente de Variação - 55,99%

QUADRO 4 - Quadro de análise de variância obtido para enraizamento de *C. glaziovii*. Os dados foram obtidos levando-se em conta os fatores tipo de meio de cultura e luminosidade.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob. > F
MEIOS	4	663,0550	165,7637	127,233	0,00001
LUZ	1	7,0312	7,0312	5,396	0,02001
MEIOS X LUZ	4	16,2250	4,0562	3,113	0,01633
RESÍDUO	190	247,5375	1,3028		
TOTAL	199	933,8487			

Média Geral - 4,22

Coefficiente de Variação - 27,03%