

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FÁTIMA ODAHARA KAJIKI



ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO DE  
MICROPROPAGAÇÃO DA ESPÉCIE NATIVA  
*Baccharis tridentata* (Asteraceae): ESTUDOS  
FISIOLÓGICOS, ANATÔMICOS E HISTOQUÍMICOS  
*in vitro*.

Este exemplar corresponde à redação final

da tese defendida pelo(a) candidato (a)

FÁTIMA ODAHARA KAJIKI

Simone Liliane Kirszenzhaft Shepherd

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do título de  
Doutor em Biologia Vegetal.

Orientadora: Dra. Simone Liliane Kirszenzhaft Shepherd

8204700

2004

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
	UNICAMP
	K123e
V	EX
TOMBO BC/	59801
PROC.	16.0117104
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	14/09/2004
Nº CPD	

Bib id 321970

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**K123e**

**Kajiki, Fátima Odahara**

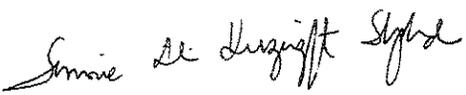
Estabelecimento do protocolo de micropropagação da espécie nativa *Baccharis tridentata* Vahl. (*Asteraceae*): estudos fisiológicos, anatômicos e histoquímicos in vitro / Marcelo de Oliveira Gonzaga. -- Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientadora: Simone Liliane Kirszenzaft Shepherd  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .  
Instituto de Biologia.

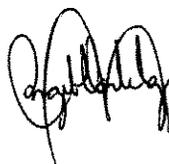
1. Propagação in vitro. 2. Asteraceas. 3. Anatomia vegetal. 4. Morfogenese.  
I. Shepherd, Simone Liliane Kirszenzaft. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Data de Defesa: 19/04/2004**

**BANCA EXAMINADORA:**

**Professora Dra. Simone L. Kirszenzaft Shepherd** 

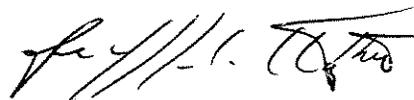
**Professor Dr. Ângelo Luiz Cortelazzo**



**Professora Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória**



**Professor Dr. Pedro Melillo de Magalhães**



**Professora Dra. Suzelei de Castro França**



**Professora Dra. Marília de Moraes Castro**

**Professor Dr. Jorge Vega**

**Aos meus pais**

**Kiyoco e Massayuki**

**Ao Takao**

**e às nossas filhas**

**Ana, Lia e Miriam**

**Com amor**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, em primeiro lugar.

À minha família, pelo apoio em todos os momentos.

À Profa. Dra Simone Liliâne Kirszenzaft Shepherd pela orientação, apoio e amizade.

À Profa. Dra. Marília de Moraes Castro, pela acolhida no Laboratório de Anatomia do Departamento de Botânica, e orientação para a realização dos estudos de densidade dos tricomas glandulares.

Ao Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo, pela acolhida e orientação no Laboratório de Biologia Celular, proporcionando as condições para a realização dos estudos anatômicos e histoquímicos.

Ao Prof. Dr. George J. Shepherd, pela auxílio inestimável nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. João Semir pela identificação das espécies botânicas utilizadas neste trabalho.

Aos Professores, Dr. Angelo L. Cortelazzo, Dr. Jorge Vega e Dr. Pedro M. Magalhães, pelas correções e sugestões valiosas durante a fase de pré-banca.

Aos professores e colegas do Departamento de Fisiologia Vegetal, pelo auxílio e transmissão de conhecimentos.

À Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, pelos ensinamentos e apoio nas análises em microscopia de varredura.

Aos funcionários do departamento de fisiologia vegetal, em especial à Dulce Regina Joaquim e ao Carlos, pelo auxílio técnico durante a realização deste trabalho.

À Antônia e Adriane, pelo apoio técnico durante a realização dos estudos no Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB.

Ao Sebastião, pelo apoio técnico durante a realização dos estudos no Laboratório de Anatomia do Departamento de Botânica.

Aos colegas do departamento de Botânica e Biologia Celular, pela disponibilidade em transferir experiências e conhecimento.

Aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação da Biologia Vegetal, pelo apoio.

À Capes, pela bolsa concedida.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

Abreviaturas.....	xiii.
Lista de Figuras.....	xiv.
Lista de Tabelas.....	xvii.
Resumo Geral.....	xviii.
Summary.....	xxi.
Introdução Geral.....	1.
Revisão de Literatura.....	6.
Objetivos Gerais.....	15.
Capítulo I – Micropropagação de espécies nativas de <i>Baccharis</i> – Otimização do protocolo.....	17.
Resumo.....	19.
1. Introdução.....	20.
2. Objetivos.....	25.
3. Material e Métodos.....	26.
3.1. Material Botânico.....	26.
3.2. Cultivo <i>in vitro</i> .....	26.
3.2.1. Estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i> .....	26.
3.2.2. Otimização da composição salina dos meios de cultivo.....	30.
3.3. Aclimação.....	30.
4. Resultados e Discussão.....	32.
4.1. Estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i> .....	32.
4.2. Otimização do cultivo <i>in vitro</i> .....	34.

4.3. Aclimatação.....	49.
5. Conclusões.....	40.
Capítulo II- Efeito da variação do pH inicial, da fonte de N e da concentração de macro-	
Nutrientes do meio de cultivo, no crescimento <i>in vitro</i> de <i>B. tridentata</i> .....	43.
Resumo.....	45.
1. Introdução.....	46.
2. Objetivos.....	48.
3. Material e Métodos.....	49.
3.1. Material Botânico.....	49.
3.2. Condição experimental.....	49.
3.3. Experimentos.....	50.
3.3.1. Efeito da variação do pH inicial do meio de cultivo.....	50.
3.3.2. Efeito do N: Variação da fonte e concentração.....	50.
3.3.3. Efeito de diferentes concentrações de macronutrientes.....	51.
3.4. Análise estatística.....	51.
4. Resultados.....	54.
4.1. Variação do pH inicial.....	54.
4.2. Efeito do N: variação da fonte e concentração.....	58.
4.3. Efeito de diferentes concentrações de macronutrientes.....	64.
5. Discussão.....	68.
6. Conclusões.....	71.

Capítulo III- Análise comparativa da anatomia das estruturas foliares de <i>Baccharis tridentata</i> cultivada em casa de vegetação, em diferentes condições <i>in vitro</i> e após aclimação.....	73.
Resumo.....	75.
1. Introdução.....	77.
2. Objetivos.....	80.
3. Material e Métodos.....	81.
3.1. Material Botânico.....	81.
3.2 Tratamentos.....	81.
3.2.1. Efeito do fotoperíodo x sacarose.....	82.
3.2.2. Efeito da alteração da vedação.....	82.
3.2.3. Efeito da adição de GA3.....	82.
3.3. Coleta das amostras.....	83.
3.4. Processamento das amostras.....	86.
3.4.1. Microscopia de Luz.....	86.
3.4.1.1. Coloração por AT .....	87.
3.4.1.2. Coloração por XP.....	87.
3.4.1.3. Coloração por PAS.....	87.
3.4.1.4. Coloração pelo Sudan Black B.....	88.
3.4.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	88.
4. Resultados.....	90.
5. Discussão.....	113.
6. Conclusões.....	118.

Capítulo IV- Estudo da densidade dos tricomas foliares em <i>B. tridentata</i> : Planta cultivada em casa de vegetação, clone cultivado <i>in vitro</i> , e clone aclimatado.....	119.
Resumo.....	121.
1. Introdução.....	122.
2. Objetivos.....	126.
3. Material e Métodos.....	127.
3.1. Material Botânico.....	127.
3.2. Tratamentos.....	127.
3.2.1. Efeito do fotoperíodo x sacarose.....	128.
3.2.2. Efeito do abaixamento da temperatura.....	128.
3.2.3. Efeito da alteração da vedação.....	129.
3.2.4. Efeito da adição de GA <sub>3</sub> .....	129.
3.3. Amostras utilizadas.....	129.
3.4. Preparo das amostras.....	130.
3.5. Contagem dos tricomas.....	130.
3.6. Análise estatística.....	130.
4. Resultados.....	131.
5. Discussão.....	140.
6. Conclusões.....	145.
Conclusões Gerais.....	147.
Anexo I : Compostos químicos presentes no gênero <i>Baccharis</i> .....	149.
Anexo II: Composição dos meios White, MS e B5.....	150.
Bibliografia citada.....	151.

## ABREVIATURAS

**AT**- Azul de Toluidina, pH 4,0

**B5** – Composição salina básica descrita por Gamborg *et al.* em 1968 para o cultivo de células de soja

**1/2B5**- Composição salina básica do meio B5, com a concentração original reduzida à metade

**FI**- Face Inferior

**FS**- Face Superior

**FAA**- Solução fixadora contendo formalina, álcool e ácido acético

**GA3**- Ácido giberélico

**MEV**- Microscopia Eletrônica de Varredura.

**MS** – Composição salina e de vitaminas descrita por Murashige & Skoog, (1962). para o cultivo *in vitro* de *Nicotiana tabacum*, acrescido de 3% de sacarose.

**1/2MS**- Composição salina básica do meio MS, com a concentração original reduzida à metade.

**PAS**- Método do PAS, oxidação pelo ácido periódico e tratamento com Reativo de Schiff.

**PVP** – polivinilpirrolidona – Utilizado no meio de cultura a 1%.

**TG**- Tricomas glandulares.

**TNG**- Tricomas não glandulares.

**XP**- Xylidine Ponceau, pH 2,5

**W**- Composição salina básica descrita por White, (1943), para cultivo de raízes de tomate.

## LISTA DE FIGURAS

Figura I.1. Planta vegetativa de <i>B. tridentata</i> e <i>B. dracunculifolia</i> .....	23.
Figura I.2. Esquema do estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i> de <i>B. tridentata</i> .....	28.
Figura I.3. Esquema do estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i> de <i>B. dracunculifolia</i> .....	29.
Figura I.4. Efeito de diferentes meios de cultivo na altura de clone de <i>B. tridentata</i> .....	36.
Figura I.5. Efeito de diferentes meios de cultivo na altura de plântulas de <i>B. dracunculifolia</i> .....	38.
Figura I.6. Esquema de micropropagação de <i>B. tridentata</i> .....	41.
Figura II.1. Altura do eixo caulinar de clone após 31 e 62 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meios com diferentes pH iniciais.....	55.
Figura II.2. Massa de matéria seca de clone de <i>B. tridentata</i> após 31 e 62 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meios com diferentes pH iniciais.....	56.
Figura II.3. Visualização da acidificação do meio de cultivo de <i>B. tridentata</i> .....	41.
Figura II.4. Crescimento de plantas de <i>B. tridentata</i> após 31 e 62 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meios com diferentes fontes de N.....	60.
Figura II.5. Efeito de diferentes fontes de N nos valores de massa de matéria seca de partes aéreas de clone de <i>B. tridentata</i> após 31 e 62 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	61.
Figura II.6. Efeito de diferentes fontes de N nos valores de massa de matéria seca de raízes de clone de <i>B. tridentata</i> após 31 e 62 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	62.
Figura II.7. Valores de pH final do meio líquido após 31 dias de cultivo <i>in vitro</i> de clone de <i>B. tridentata</i> .....	63.
Figura II.8. Efeito de diferentes concentrações de macronutrientes do meio de cultura na altura de clone de <i>B. tridentata</i> após 31 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	65.

Figura II.9. Efeito de diferentes concentrações de macronutrientes do meio de cultura nos valores de massa de matéria seca de partes aéreas e raízes de clone de <i>B. tridentata</i> após 31 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	66.
Figura II.10. Efeito de diferentes concentrações de macronutrientes na razão entre massa de matéria seca de raízes e partes aéreas (R/C) de clone de <i>B. tridentata</i> após 31 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	67.
Figura III.1. Esquema de obtenção do material botânico utilizado nos experimentos.....	84.
Figura III.2. Esquema de coleta de amostras para os estudos anatômicos e histoquímicos.....	85.
Figura III.3. Comparação da nervura principal e mesofilo de <i>B. tridentata</i> cultivada em casa de vegetação (c.v.), <i>in vitro</i> e aclimatada.....	95.
Figura III.4. Corte transversal de folhas adultas de clones de <i>B. tridentata</i> cultivada em frascos com tampão de algodão.....	97.
Figura III.5. Cortes transversais de <i>B. tridentata</i> cultivada <i>in vitro</i> sob fotoperíodo de 16 h e fotoperíodo de 16 h/ luz contínua.....	97.
Figura III.6. Cortes transversais de <i>B. tridentata</i> cultivada <i>in vitro</i> com 3%, 2% e 1% de sacarose.....	99.
Figura III.7. TG de <i>B. tridentata</i> cultivada em c.v. e <i>in vitro</i> .....	101.
Figura III.8. TNG de <i>B. tridentata</i> cultivada em casa de vegetação e <i>in vitro</i> .....	103.
Figura III.9. TG de folhas jovens de <i>B. tridentata</i> cultivada em c.v. e <i>in vitro</i> , corados com AT.....	105.
Figura III.10. TG de folhas jovens de <i>B. tridentata</i> cultivada em c.v. e <i>in vitro</i> , corados com PAS , XP e Sudan Black B.....	107.

Figura III.11. Corte transversal de ápices caulinares revelando a presença de rafídeos em plantas cultivadas em c.v. e <i>in vitro</i> .....	109.
Figura III.12. Vista dos TG de <i>B. tridentata</i> cultivada em c.v. e <i>in vitro</i> através de MEV....	111.
Figura IV.1. Comparação da densidade dos TG em plantas cultivadas em c.v., <i>in vitro</i> e aclimatadas.....	133.
Figura IV.2. Comparação da densidade dos TNG em plantas cultivadas em c.v., <i>in vitro</i> e aclimatadas.....	134.
Figura IV.3. Efeito de fotoperíodo x sacarose na densidade de TG em clones de <i>B. tridentata</i> cultivados <i>in vitro</i> .....	135.
Figura IV.4. Efeito do abaixamento da temperatura na densidade dos TG em clones de <i>B. tridentata</i> cultivados <i>in vitro</i> .....	136.
Figura IV.5. Efeito da alteração da vedação na densidade dos TG em clones de <i>B. tridentata</i> cultivados <i>in vitro</i> .....	137.
Figura IV.6. Efeito da adição de GA <sub>3</sub> na densidade dos TG em clones de <i>B. tridentata</i> cultivados <i>in vitro</i> .....	138.
Figura IV.7. Comparação da densidade dos TG em plantas cultivadas em c.v., <i>in vitro</i> e aclimatadas após otimização.....	139.

## LISTA DE TABELAS

Tabela I.1. Efeito de diferentes meios de cultivo na massa de matéria seca de partes aéreas e raízes de clones de <i>B. tridentata</i> após 31 dias de cultivo.....	36.
Tabela I.2. Efeito de diferentes meios de cultivo na massa de matéria seca de partes aéreas e raízes de plântulas de <i>B. dracunculifolia</i> após 60 dias de cultivo.....	38.
Tabela II.1. Composição de N nos meios com diferentes fontes e concentração de N.....	52.
Tabela II.2. Composição salina dos macronutrientes do meio MS em que se variou a concentração dos principais nutrientes minerais.....	53.
Tabela II.3. Valores iniciais de pH e após 31 dias de cultivo <i>in vitro</i> de <i>B. tridentata</i> .....	57.

## RESUMO GERAL

Várias espécies do gênero *Baccharis* têm sido usadas na medicina popular. Efeitos farmacológicos de muitas delas já foram comprovados, e, nos últimos anos, os compostos químicos de mais de 60 espécies foram identificados. No entanto, são raros os estudos biotecnológicos em espécies deste gênero. *B. tridentata* e *B. dracunculifolia* são plantas nativas, aromáticas e produzem óleo essencial, no qual os sesquiterpenos em maior concentração são: nerolidol, espatulenol e  $\delta$ -cadineno. Recentemente, foi comprovado o efeito inibitório do nerolidol no crescimento de *Plasmodium falciparum*, o mais perigoso agente causador da malária. Devido a alta mortalidade causada por esta doença e ao fato deste parasita estar se tornando resistente aos medicamentos convencionais, pesquisas com plantas que apresentam potencial terapêutico são importantes. Com a finalidade de obter rapidamente um grande número de plantas com as mesmas características da planta mãe, foram desenvolvidos protocolos de micropropagação para as duas espécies. A micropropagação de *B. tridentata* foi estabelecida através de ápices caulinares de uma única planta, permitindo a formação de um banco de plantas homogêneas (clone) que foram utilizadas como fonte de explantes para os experimentos posteriores. Foi desenvolvido o protocolo de aclimação para esta espécie, com 80% de sobrevivência das plantas deste clone no ambiente *ex-vitro*. Já para *B. dracunculifolia*, devido a intensa oxidação dos explantes, a micropropagação foi possível somente através da germinação de sementes. A forte recalcitrância ao cultivo *in vitro* dificultou o prosseguimento dos experimentos com esta espécie.

A espécie *B. tridentata* cresce em pequenas cavidades nas superfícies rochosas do Planalto do Itatiaia. A peculiaridade deste habitat levou-nos a realizar alguns estudos fisiológicos *in vitro*, visando contribuir para a compreensão de alguns mecanismos de adaptação desta espécie, além de permitir o aperfeiçoamento do protocolo de

micropropagação. Foram avaliados os efeitos da variação do pH inicial, da fonte preferencial de nitrogênio e da concentração de alguns macronutrientes no crescimento. Após 31 dias de cultivo, o crescimento das plantas resultou em acidificação do meio, com pH final de 3,5. Este clone apresentou maior crescimento (altura e massa de matéria seca) com fonte de nitrogênio constituída de mistura de  $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ , quando comparado com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  fornecidos isoladamente. O aumento do peso seco das raízes foi favorecido pela diminuição da concentração de magnésio no meio.

Estudos recentes têm demonstrado que as culturas de partes aéreas podem constituir fonte viável de compostos secundários úteis, principalmente aqueles produzidos em estruturas altamente diferenciadas, como os tricomas glandulares (TG). Entretanto, plantas cultivadas *in vitro* apresentam, em geral, menor produção destes compostos, quando comparadas com aquelas cultivadas em campo. Esta baixa produção do cultivo *in vitro* tem sido relacionada com o menor grau de diferenciação. Este presente trabalho investigou os efeitos de alguns fatores microambientais, nutricionais e fitohormonais na diferenciação de algumas estruturas foliares, especialmente os TG, de um clone de *B. tridentata* cultivado *in vitro*. As plantas cultivadas *in vitro* apresentaram TG morfológicamente semelhantes aos da planta da casa de vegetação e do clone aclimatado. A utilização do tampão de algodão no frasco de cultura (em substituição ao PVC utilizado comumente como vedação) resultou em maior diferenciação das células paliçádicas do mesofilo. Neste tratamento, foi observado espaço subcuticular formado pela distensão da cutícula dos TG, sugerindo a secreção de material. O uso da vedação de algodão alterou o microambiente do frasco de cultura (diminuição da umidade e alteração das trocas gasosas) e provavelmente, favoreceu a diferenciação destas estruturas foliares.

Outra alternativa para aumentar a produção de compostos acumulados nos TG é através do aumento da densidade destas estruturas (número de TG/mm<sup>2</sup>). Desta forma, investigamos o efeito dos mesmos fatores microambientais, nutricionais e fitohormonais,

acima mencionados na densidade dos tricomas, em folhas adultas do clone de *B. tridentata* cultivado *in vitro*. Plantas cultivadas em casa de vegetação e clone aclimatado apresentaram maior densidade de TG do que o clone cultivado *in vitro*. Nos três casos a densidade dos TG foi maior na epiderme superior. Entre os tratamentos aplicados às plantas cultivadas *in vitro*, foi constatada interação altamente significativa da concentração de sacarose e fotoperíodo. A maior densidade foi favorecida pela luz contínua e 3% de sacarose. Embora o número de TG/mm<sup>2</sup> (otimizado) obtido *in vitro* tenha sido menor do que o apresentado pelas plantas cultivadas em casa de vegetação e pelo clone aclimatado, ele foi significativo, principalmente se considerarmos o curto tempo de cultivo (31 dias). Portanto, há possibilidade de melhorar estes resultados, aumentando o tempo de exposição aos tratamentos.

## SUMMARY

Several species of the genus *Baccharis* have been used in folk medicine. Pharmacological effects of many of them were confirmed, and, in the last years more than 60 species have been investigated chemically. However, biotechnological studies are rare. *B. tridentata* Vahl. and *B. dracunculifolia* DC. are native, aromatic plants and they produce essential oil, in which nerolidol, sphaulenol and  $\delta$ -cadinene are major sesquiterpenes. Recently, was demonstrated the inhibitory effect of nerolidol on the growth of *Plasmodium falciparum*, the most dangerous species that causes malaria. Due the high mortality caused by this disease and the fact of this parasite is becoming resistant to conventional drugs, researches with plants that present therapeutic potential are very important. With the purpose of obtaining a great number of plants with the same characteristics of parents plants, and quickly, micropropagation protocols were developed. The micropropagation of *B. tridentata* was established through shoot apex of a single plant, allowing the formation of homogeneous plant bank (clone), with served as explant sources for later experiments. The acclimatization of micropropagated plants was successful with 80 % of survival in the *ex-vitro* environment. For *B. dracunculifolia*, due to intense oxidation of explants, the micropropagation was only possible through the germination of seeds. The strong recalcitrant behaviour to the *in vitro* culture hindered to following the experiments of this species.

Plants of *B. tridentata* grow in small cavities on the rocky surfaces of the Itatiaia Plateau. The peculiarity of this habitat took us to accomplish some *in vitro* physiological studies, seeking understanding adaptation mechanisms of this species, besides allowing the improvement of the micropropagation protocol. We verified the effects of the initial pH variation, the preferential nitrogen source and the concentration of some macronutrients on the growth. After 31 days of *in vitro* culture, the growth of clone resulted in media acidification,

with final pH as 3,5. The clone presented larger growth (height and dry matter) with  $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$  mixture, when compared with  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$  supplied separately. The decrease of magnesium concentration in the culture media favoured the increment of dry matter by roots.

Recent studies have demonstrated that shoot cultures can be a viable source of useful secondary compounds, mainly those produced in highly differentiated structures, as glandular trichomes (TG). However, *in vitro* cultured plants present, in general, smaller production compared with greenhouse grown plants. The lower production feature of *in vitro* cultured plants has been related with little differentiation degree. This present work investigated some microenvironmental, nutritional and phytohormonal factors in the differentiation of clone leaf structures, especially glandular trichomes. TG of tissue cultured plants were morphologically similar to that of greenhouse grown plants and acclimated clone. The use of cotton lid in the culture vessel (in substitution to pvc closure) resulted in larger differentiation of palisade mesophyll cells. In this treatment, a subcuticular space formed by the detachment of cuticle were observed on the glandular trichomes, suggesting the production of secretory material. The use of cotton lid changes the vessel microenvironment (decrease of the humidity and increase of gaseous exchange) and probably, enhanced the leaf structures differentiation.

Another alternative to increase the production of TG produced compounds is through the increase of the density of these structures (number of TG/mm<sup>2</sup>). This way, we investigated the effect of the same microenvironmental, nutritional and phytohormonal factors, in the density of trichomes, in adult leaves of tissue cultured clone. Greenhouse grown plants and acclimated clone

presented larger density of TG than *in vitro* cultured plants. The density of TG was always larger in adaxial epidermis. Among the treatments applied to the *in vitro* cultured clone, there was highly significant interaction of the sucrose concentration and photoperiod on the

trichomes number. The largest density was favoured by the continuous light and 3% of sucrose. Although the best results of TG density obtained in the tissue cultured plants has been smaller than greenhouse grown plants and acclimated clone, the *in vitro* results were significant, mainly, if consider the short time of culture (31 days). Thus, there is possibility to improve these results increasing the time of exposure to the treatment.



## INTRODUÇÃO GERAL

As plantas produzem muitos compostos através do seu metabolismo secundário que são potencialmente úteis ao ser humano. Devido à notável atividade biológica/farmacológica ou ainda pelas características físico-químicas que apresentam, estes compostos são utilizados como medicamentos, pesticidas, aromatizantes, corantes, perfumes, etc. A grande demanda por estes produtos naturais aumentou nos últimos anos, devido aos efeitos tóxicos, colaterais, apresentados por alguns produtos sintéticos à saúde humana e ao meio ambiente. A complexidade e o alto custo da síntese química, e muitas vezes a sua inexequibilidade, contribuem para a revalorização da planta como fonte destes produtos (Balandrin *et al.*, 1985; Alfermann & Petersen, 1995).

O fornecimento contínuo, homogêneo e de alta qualidade dos produtos naturais através do cultivo tradicional de plantas, enfrenta dificuldades relacionadas à dependência aos fatores climáticos e à ocorrência de doenças (Tabata, 1977). Neste contexto, o cultivo *in vitro* apresenta-se como uma alternativa viável para a produção dos compostos naturais. As vantagens da produção *in vitro* incluem: condições de cultivo mais controladas, em menor tempo e ocupando menor espaço físico, com maior controle de fitossanidade. Além disso, com a manipulação das condições de cultivo, pode-se aumentar a produção (que em muitos casos é baixa na natureza) e favorecer a biossíntese de novos compostos não produzidos pela própria planta (Alfermann & Petersen, 1995).

Nas últimas décadas muitos esforços têm sido realizados para viabilizar a produção dos compostos secundários úteis através do cultivo *in vitro*. Resultados positivos foram relatados em muitos sistemas estabelecidos, com a obtenção de uma produção *in vitro* maior do que no cultivo tradicional. No entanto, a produção em escala comercial tem se restringido a poucos

produtos. Para muitas plantas, o cultivo *in vitro* resulta em produção baixa ou nula do composto desejado (Whitaker & Hashimoto, 1986).

Dois aspectos da regulação da biossíntese de compostos secundários em plantas devem ser considerados: a interação do metabolismo primário com o secundário e a necessidade da diferenciação bioquímica. A indução de diferenciação morfológica também é de grande importância. Sabe-se que muitas vias biossintéticas são expressas em células ou tecidos diferenciados específicos, sugerindo que a expressão do metabolismo secundário e a diferenciação morfológica podem ser induzidos pelo mesmo estímulo (Fowler, 1985; França, 1999).

Vários autores têm relacionado a biossíntese de compostos secundários com a diferenciação de cloroplastos e a atividade fotossintética (Nielsen *et al.*, 1991; Duke & Paul, 1993). No caso da biossíntese dos terpenóides, ocorre um controle espacial, delimitado por estruturas físicas, tanto em nível histológico, quanto celular e sub-celular (McGarvey & Croteau, 1995).

Os tricomas glandulares constituem estruturas diferenciadas da epiderme (Werker, 2000) e as plantas que apresentam estas estruturas, geralmente produzem grande variedade de compostos secundários bioativos (Duke *et al.*, 2000). Em alguns casos, como de certos terpenos de *Mentha sp* (Gershenzon *et al.*, 1989) e de *Artemisia annua* (Duke *et al.*, 1994), tem sido claramente demonstrado que apenas os tricomas glandulares acumulam certos compostos.

A biossíntese de compostos produzidos exclusivamente nestas estruturas especializadas parece não ocorrer em culturas de calos e suspensão de células. Esta limitação que as culturas indiferenciadas apresentam, tem estimulado a exploração do potencial que as culturas de partes aéreas de plantas oferecem para produção de compostos secundários úteis (Heble, 1985), assim como, para preservação e propagação de espécies que produzem estes

compostos. A micropropagação de plantas potencialmente úteis possibilita a obtenção de grande número de plantas em curto período de tempo e espaço reduzido. Quando ela ocorre via ápices caulinares existe a vantagem da manutenção das características da planta mãe (Grattapaglia & Machado, 1998; França, 1999), muito útil no caso de plantas dióicas quando um dos sexos é mais valorizado comercialmente (Bhojwani & Razdan, 1983). Através desta técnica é possível obter, a partir de uma única planta, um banco de plantas homogêneas para estudos *in vitro* em que a uniformidade das amostras é necessária para a conclusão dos resultados.

Vários autores mencionam que a produção de compostos secundários através de cultivo de partes aéreas é possível. No entanto, tem sido observado que, em geral, a produção *in vitro* é mais baixa quando comparada à produção da planta cultivada em condições naturais (Woerdenbag *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 1995; Heble, 1985). Isto poderia ser resultado das características fisiológicas e anatômicas que as plantas cultivadas *in vitro* apresentam. Segundo alguns autores (Wetzstein & Sommer, 1982; Johansson *et al.*, 1992), estas plantas apresentam características anatômicas típicas, com pouca diferenciação dos tecidos vasculares, clorofilianos e epidérmicos.

Alguns estudos demonstraram que as culturas de tecidos apresentam baixa atividade fotossintética (apesar de possuírem capacidade para realizá-la), decorrente de condições inadequadas de concentração de CO<sub>2</sub> e intensidade luminosa, além da nutrição heterotrófica deste tipo de cultivo (Kozai *et al.*, 1995; Caldas *et al.*, 1998). Também foi verificado que a sacarose que é fornecida no cultivo *in vitro* inibe a diferenciação dos cloroplastos e a síntese de clorofila, e que a diminuição da sua concentração no meio de cultivo estimula a atividade fotossintética (Edelman & Hanson, 1972; Capellades *et al.*, 1991).

Outro fator que parece influenciar a diferenciação das plantas é a vedação utilizada no cultivo *in vitro*. Dependendo do tipo de vedação pode haver alteração das trocas gasosas, da

umidade relativa e da concentração de compostos voláteis, como o etileno, no interior dos frascos (Kavanagh *et al.*, 1991; Kozai *et al.*, 1995).

Em geral, os estudos dos efeitos ambientais (microambiente) na fisiologia e anatomia das plantas cultivadas *in vitro* têm sido realizados por vários pesquisadores, com o objetivo de otimizar a obtenção de plantas mais aptas a sobreviver no ambiente *ex-vitro* durante a aclimatação (Kozai, 1991; Majada *et al.*, 2000). No entanto, poderiam também ser direcionados para a obtenção de plantas com maior capacidade de produzir compostos secundários *in vitro*. Neste sentido, a estratégia proposta por alguns autores (McCaskill & Croteau, 1999; Duke *et al.*, 2000) de aumentar a produção de compostos potencialmente úteis que são acumulados nos tricomas glandulares, através do aumento da densidade destas estruturas, pode constituir um parâmetro de avaliação destas plantas.

Os tricomas constituem grande campo para aplicação de técnicas histoquímicas, devido à diversidade nas formas, e no caso dos tricomas glandulares, à variação dos compostos secretados. Uma variedade de procedimentos histoquímicos adaptados tanto à microscopia de luz quanto à eletrônica tem permitido o conhecimento de vários aspectos do desenvolvimento dos tricomas (Peterson & Vermeer, 1984).

O cultivo *in vitro* oferece um grande potencial de manipulação dos fatores relacionados com o crescimento e desenvolvimento das plantas, que pode ser utilizado para o estudo das condições que favoreçam a obtenção de plantas mais diferenciadas tanto no aspecto anatômico quanto bioquímico, condição esta que poderia resultar em maior produção dos compostos ativos.

*Baccharis tridentata* Vahl. e *B. dracunculifolia* DC. são plantas nativas, dióicas (Barroso, 1986), aromáticas, cujo óleo essencial tem despertado o interesse de vários pesquisadores (Queiroga *et al.*, 1990, 1996; Loayza *et al.*, 1995; Ferracini *et al.*, 1996). As estruturas secretoras destas espécies foram caracterizadas como ductos secretores e tricomas

glandulares (Castro *et al.*, 1997). *B. tridentata* tem sido usada em algumas regiões do Brasil como febrífuga e diurética (Uphof, 1968), enquanto o óleo essencial de *B. dracunculifolia* (óleo de vassoura) é produzido comercialmente no Sul do Brasil e utilizado em perfumaria (Souza *et al.*, 1991; Queiroga *et al.*, 1990). Os constituintes sesquiterpênicos em maior concentração nos óleos essenciais destas duas espécies são: nerolidol e espatulenol (*B. tridentata*) e nerolidol e  $\beta$ -selineno (*B. dracunculifolia*) (Ferracini *et al.*, 1996). Recentemente, foi comprovado o efeito inibitório do nerolidol no crescimento de *Plasmodium falciparum*, o agente causador da malária (Lopes *et al.*, 1999; Macedo *et al.*, 2002). Devido à gravidade desta doença e à resistência do parasita aos medicamentos sintéticos (WHO, 1999), pesquisas com plantas que apresentam potencial terapêutico são de grande importância.

## REVISÃO DA LITERATURA

### O GÊNERO *Baccharis*

O gênero *Baccharis* (Família: Asteraceae; tribo: Astereae; Subtribo: Baccharinae) ocorre nas Américas, do México até a Argentina, sendo constituído por cerca de 400 espécies, grande parte delas nativas do Brasil (Hoehne, 1939; Souza *et al.*, 1991). São plantas anuais ou perenes, subarbustos ou arbustos, ou mais raramente árvores de pequeno porte a mediano, dióicas, com capítulos masculinos e femininos ocorrendo em plantas separadas (Barroso, 1986). O cerrado brasileiro é uma das áreas mais ricas em espécies de *Baccharis* (Boldt, 1989, citado por Ferracini *et al.*, 1996) e há muitas espécies descritas em campos de altitude (Martinelli *et al.*, 1996). Muitas espécies do gênero *Baccharis* são utilizadas na medicina popular para curar várias doenças. As espécies *B. trimera* (= *B. genistelloides*), *B. retusa* e *B. articulata*, conhecidas popularmente como carqueja ou carquejinha, são muito difundidas nos estados do leste e sul do Brasil, sendo usadas como anti-reumáticas, anti-helmínticas, no diabetes (Simões *et al.*, 1986; Souza *et al.*, 1991). Outras espécies como por exemplo, *B. stenocephala*, *B. tridentata*, *B. articulata* são também utilizadas como febrífugas, (Hoehne, 1939; Uphof, 1968). Relata-se para grande parte delas o uso externo nas feridas e inflamações (Simões *et al.*, 1986; Souza *et al.*, 1991). Algumas espécies deste gênero são bem conhecidas como sendo muito venenosas, principalmente no sul do Brasil e Argentina, onde a grande ocorrência de *B. coridifolia*, *B. megapotamica* e *B. artemisioides* tem causado o envenenamento do gado (Hoehne, 1939).

Alguns pesquisadores identificaram os compostos ativos destas espécies de *Baccharis* venenosas como sendo do complexo macrocíclico tricoteceno (Anexo I): Roridinas, bacarinóides e verrucarinas (Jarvis & Midiwo, 1988; Rizzo *et al.* 1997). Similarmente a outros

casos, já relatados, em que compostos muito tóxicos apresentaram atividade biológica ou farmacológica, foi verificada atividade citotóxica dos macrocíclicos tricotecenos contra células tumorais (Mongelli *et al.* 1997).

Este gênero tem sido muito investigado do ponto de vista fitoquímico (Bohlmann *et al.*, 1985), revelando uma grande variedade de constituintes químicos com atividade biológica interessante (Gené, M.R. *et al.*, 1996; Mongelli *et al.*, 1997). Quimicamente, a ausência ou raridade das lactonas sesquiterpênicas e alcalóides parece distinguir a tribo Astereae das demais tribos que compõem a família Asteraceae. Alcalóides têm sido relatados apenas em alguns poucos gêneros (Herz, 1977). No óleo essencial de muitas espécies de *Baccharis*, os constituintes predominantes são: os monoterpenos (limoneno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol etc..) e os sesquiterpenos ( $\beta$ -cariofileno, nerolidol,  $\delta$ -cadineno, espatulenol,  $\alpha$ -cadinol, etc.) (Loayza *et al.*, 1995; Queiroga *et al.*, 1996; Ferracini *et al.*, 1996; Zunino *et al.*, 1998). Diterpenóides do tipo ent-clerodanos e labdanos foram relatados em *B. neglecta*, *B. salicifolia*, *B. sarothroides* (Jakupovic *et al.*, 1990) e em *B. scoparia*, *B. microcephala* (Bohlmann *et al.*, 1985). Entre os triterpenóides e esteróis já descritos, alguns são de larga ocorrência no reino vegetal, como sitosterol e estigmasterol, enquanto que outros, como os óxidos de *Baccharis*, são específicos deste gênero não ocorrendo em outras espécies (Herz, 1977).

Atividades biológicas e farmacológicas de várias espécies foram comprovadas nos últimos anos revelando o potencial deste gênero, principalmente se considerarmos o número relativamente pequeno de pesquisas nesta área. Além da atividade antineoplásica dos tricotecenos (Mongelli *et al.*, 1997), foram também comprovados os efeitos anti-inflamatório e analgésico de *B. trimeria* (Gené *et al.*, 1996), antioxidante de *B. trinervis* (Heras *et al.*, 1998), antimicrobiano do óleo essencial de *B. notoserigila* (Cobos *et al.*, 2001), e antifúngico de *B. pedunculata* (Rahalison *et al.*, 1995).

Um aspecto interessante relacionado ao dimorfismo sexual neste gênero, refere-se aos diferentes constituintes químicos encontrados em plantas masculinas e femininas de algumas espécies. No óleo essencial de *B. dracunculifolia*, Ferracini *et al.*, (1996) verificaram que a razão de mono/sesquiterpenos é diferente nas plantas masculinas e femininas. Jarvis & Midiwo (1988) relataram a presença das substâncias do complexo macrocíclico tricoteceno (roridinas, bacarinóides e verrucarinas) na espécie nativa *B. coridifolia*, sendo que estes compostos estavam restritos apenas às inflorescências das plantas femininas após a polinização.

Os macrocíclicos tricotecenos têm sido relatados apenas em fungos do solo, por exemplo, *Fusarium* e *Myrothecium*. A constatação destes compostos em espécies de *Baccharis* abre um vasto campo para pesquisas sobre o efeito de possíveis interações bioquímicas e/ou transferências de material genético entre plantas e fungos na produção de compostos secundários (Jarvis & Midiwo, 1988; Rizzo *et al.*, 1997).

## TRICOMAS

Tricomas são estruturas unicelulares ou multicelulares que se originam da protoderme e compõem o indumento de um grande número de plantas. Os tricomas podem ser classificados em glandulares (TG) e não glandulares (TNG). A principal característica para distinção entre os TNG é a morfologia, enquanto os TG são classificados de acordo com as substâncias químicas que secretam (Werker, 2000). Tem sido sugerido que os TG de algumas espécies se desenvolveram filogeneticamente dos TNG. Na espécie *Avicenia marina*, os dois tipos de tricomas são iniciados e se desenvolvem similarmente até um determinado estágio, a partir do qual, as diferenças entre os dois tipos começam a aparecer (Fahn & Shimony, 1977, citado por Fahn, 1988).

Os tricomas não glandulares são classificados de acordo com a morfologia em unicelular ou multicelular e podem ser unisseriados, bisseriados ou multisseriados. Esta mesma classificação é válida para os tricomas glandulares. Nos TG multicelulares, podemos identificar uma cabeça terminal secretora, uni ou multicelular, um pedúnculo e uma base, ambos com uma ou mais células (Werker, 2000). No gênero *Baccharis* os TG são bisseriados, com 4-5 pares de células, apresentando-se agregados em depressões da epiderme (Castro, 1987).

Os TG que secretam substâncias lipofílicas ocorrem em muitas famílias, como Lamiaceae, Asteraceae, Geraniaceae, Solanaceae e Cannabinaceae. Os tricomas secretores de muitas asteráceas são multicelulares e bisseriados. Podem ser sésseis ou pedunculados. Todos secretam outros compostos além das substâncias lipofílicas (Fahn, 2000). Em *Inula viscosa*, Werker & Fahn (1981, citado por Fahn, 1988), verificaram a secreção de proteínas e polissacarídeos, além dos compostos lipofílicos. Entre os compostos lipofílicos, os terpenos são predominantes. Estudos analíticos têm confirmado que em geral os TG contêm monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos característicos da planta (Croteau & Johnson, 1984; Kelsey *et al.*, 1984).

Estudos recentes têm comprovado que alguns TG não apenas acumulam mas sintetizam os compostos da secreção. Gershenzon *et al.*, (1989), demonstraram que os TG são o único sítio de biossíntese de monoterpenos nas folhas de *Mentha spicata*.

O desenvolvimento dos tricomas começa nos estágios iniciais do desenvolvimento das folhas, freqüentemente antes do desenvolvimento dos estômatos, e algumas vezes antes do primórdio foliar poder ser distinguido (Werker, 2000). De acordo com Ascensão *et al.*, (1997) três fases de desenvolvimento dos TG podem ser observadas: pré-secretora, secretora e pós-secretora. Concomitante com a produção e acumulação do material secretado, desenvolve-se um espaço sub-cuticular formado pela separação e distensão da cutícula. Segundo Fahn

(2000), o material secretado pode ser exsudado através de minúsculos poros ou ser liberado após ruptura da cutícula.

Uma das principais funções atribuídas aos tricomas refere-se à proteção. A planta precisa de proteção contra herbívoros e patógenos, iluminação excessiva, temperaturas extremas, perda de água, etc. Uma densa cobertura de TNG pode servir como barreira mecânica contra a maioria dos fatores acima citados. Os TG, que secretam substâncias lipofílicas podem servir como defesa contra vários tipos de herbívoros e patógenos (Werker, 2000). Nestes tricomas, os terpenóides, que são os principais componentes da secreção, estabelecem uma complexa interação com os insetos, podendo atrair, repelir, ou envenenar (Wagner, 1991). Em algumas espécies do deserto, a principal função dos TG é produzir grandes quantidades de exsudatos que formam uma camada contínua na superfície da planta, aumentando a reflexão da luz e portanto reduzindo a temperatura da folha (Dell & McComb, 1978, citado por Wagner, 1991).

Dentre os materiais secretados, alguns são fitotóxicos, sugerindo que são seqüestrados nos tricomas para evitar autotoxicidade e podem desempenhar função alelopática (Duke *et al.*, 1994).

Muitos dos compostos produzidos pelos tecidos glandulares são comercialmente importantes devido às funções que desempenham (atração e defesa de insetos por ex.), contribuindo para o sabor e aroma de muitas plantas, ou por constituírem especialidades químicas utilizadas na indústria para várias finalidades (McCaskill & Croteau, 1999).

O potencial antibiótico e antimicrobiano do material secretado pelos tricomas glandulares tem sido reconhecido há muito tempo. Mono, sesqui, di e triterpenos, lactonas sesquiterpênicas, flavonas e isoflavonas têm apresentado atividade antibiótica, antimicrobiana, antifúngica e citostática (Wagner, 1991; Kelsey *et al.*, 1984). Outras atividades biológicas e/ou farmacológicas de várias substâncias acumuladas nos TG foram comprovadas nos últimos

anos, revelando o potencial destas estruturas secretoras como fonte de compostos potencialmente úteis.

Certos tricomas podem acumular altos níveis de exsudatos (10% do peso seco das folhas). Considerando que os compostos lipofílicos não são facilmente armazenados em grandes quantidades dentro das células, a capacidade dos TG acumularem a secreção no espaço subcuticular, pode ser vantajosa, quando se pretende aumentar a produção dos seus constituintes (Wagner, 1991).

Dentre os compostos secundários de interesse produzidos pelas plantas, grande parte são produzidos pelos TG. Devido a alta probabilidade dos compostos produzidos nos TG apresentarem atividade biológica, estratégias desenvolvidas para a descoberta de novos compostos ativos deveriam incluir o “screening” de espécies com TG e a extração seletiva destes tricomas (Duke *et al.*, 2000).

Recentemente alguns pesquisadores têm discutido a possibilidade de aumentar o número (densidade) dos tricomas e/ou aumentar a sua capacidade biossintética, como estratégia para o incremento da produção dos compostos produzidos nestas estruturas (McCaskill & Croteau, 1999; Duke *et al.*, 2000). Segundo Fahn (1988), alguns fatores podem influenciar o desenvolvimento dos tecidos secretores. Em Pinaceae alguns autores relataram o efeito de ferimentos na formação de ductos de resina. Além disso, tem sido demonstrado o efeito da aplicação de etileno, principalmente ethrel (nome comercial do ácido 2-cloroetilfosfônico), no desenvolvimento de ductos de gomas em *Citrus*.

Considerando as vantagens oferecidas pela cultura de tecidos, principalmente relacionadas com o controle das condições de cultivo e a ampla possibilidade de manipulação, a cultura de partes aéreas (“shoot cultures”) pode constituir uma alternativa adequada para o estudo dos efeitos que interferem na formação dos tricomas glandulares.

## CULTIVO DE PARTES AÉREAS (“SHOOT CULTURE”) PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS SECUNDÁRIOS.

Durante a última década muitos esforços têm sido realizados para viabilizar a produção de metabólitos secundários através de culturas de células. Das várias culturas testadas, algumas se mostraram promissoras para uma produção em larga escala, como: ácido rosmarínico (*Coleus blumei*), derivados da shikonina (*Lithospermum erythrorhizon*), ubiquinona (*Nicotiana tabacum*) e berberina (*Coptis japonica*). Entretanto, a grande maioria das culturas de células falha em sintetizar os compostos desejados ou perdem a capacidade de sintetizar durante o sub-cultivo (Whitaker & Hashimoto, 1986).

Devido a limitação que as culturas indiferenciadas apresentam, torna-se importante explorar métodos adicionais do cultivo *in vitro* para obter constituintes úteis das plantas. A habilidade de muitas plantas medicinais desenvolverem novas plantas a partir de meristema apical, tem aberto muitas possibilidades para a produção de produtos naturais de importância, além de possibilitar a preservação e propagação de genótipos valiosos (Heble, 1985).

Ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados são os explantes mais indicados na propagação clonal *in vitro*. Eles possuem determinação para o crescimento vegetativo e, satisfeitas as necessidades nutricionais, irão se desenvolver naturalmente em plantas. A fidelidade genética é alta, não tendo sido observadas variações nas plantas regeneradas de culturas iniciadas a partir de ápices caulinares. Em alguns casos, na base do explante ocorre a proliferação de uma massa de células, as quais subseqüentemente produzem gemas caulinares. Neste caso, de organogênese indireta, a passagem por calo, pode induzir variabilidade genética indesejada (Gratapaglia & Machado, 1998).

Alguns pesquisadores têm relatado que plantas *in vitro* sintetizam compostos valiosos, mas a produção é mais baixa do que no cultivo tradicional. Em *Atropa belladonna*, quando as

plantas micropropagadas foram transplantadas para o campo, exibiram a mesma produção da planta mãe, indicando que as plantas *in vitro* possuíam a informação genética para a biossíntese dos alcalóides, mas que o estado juvenil não permitiu que ela ocorresse (Heble, 1985). A produção do composto antimalárico artemisinina através do cultivo de partes aéreas de *Artemisia annua*, também tem sido mais baixa do que a produzida pelas plantas cultivadas em casa de vegetação e em campo (Ferreira *et al.*, 1995). Apesar da artemisinina não ser encontrada nas raízes, a presença destas estruturas parece aumentar a produção deste composto nas culturas de partes aéreas. Isto sugere que, o completo desenvolvimento do potencial biossintético dos tricomas glandulares de *A. annua*, requer algum fator produzido nas raízes (Ferreira & Janick, 1996).

Woerdenbag *et al.*, (1993) verificaram que concentrações mais baixas de sacarose no meio de cultivo (1 % e 0,5%) favoreceram a produção de artemisinina em cultura de partes aéreas de *A. annua*, e que nestas condições, a atividade fotossintética destas plantas foi maior.

Outro fator que pode afetar a produção de compostos secundários é a interação planta-planta através da liberação de substâncias aleloquímicas. Segundo França (1999), o co-cultivo *in vitro* de espécies medicinais poderia resultar em interações positivas, induzindo aumento na produção de metabólitos secundários bioativos. Pereira *et al.* (1998, citada por França, 1999) relataram que o co-cultivo *in vitro* de *Cephaelis ipecacuanha* e *Eclipta Alba* triplicou a produção da biomassa com rendimento quatro vezes maior em emetina (1,29 mg/g).

Um aspecto importante a ser considerado na produção *in vitro* de compostos secundários refere-se ao tempo de cultivo. Apesar da produção dos compostos, em geral, ser mais baixa nas plantas *in vitro*, ela pode ser vantajosa, quando comparado o tempo necessário para produzi-lo em condições naturais. Por exemplo, espécies de *Cinchona* produzem e acumulam os alcalóides antimaláricos quinina e quinidina nas cascas dos ramos, após 8 a 20 anos de cultivo. É interessante observar que culturas de partes aéreas, de 8 semanas de idade,

podem acumular cerca de 1% dos alcalóides das cascas e 22% dos alcalóides presentes em plantas de *Cinchona* de 1 ano (Chung & Staba, 1988).

Uma das vantagens do cultivo *in vitro* refere-se à possibilidade de ocorrer biossíntese de novos compostos, potencialmente úteis, não produzidos pelas plantas no cultivo tradicional. Constabel *et al.*(1982) relataram que plantas de *Catharanthus roseus* regeneradas *in vitro* acumularam vindolina que é um monômero de vimblastina, alcalóide anticancerígeno. Este composto não tem sido isolado de cultura de células. Estes estudos demonstraram que a biossíntese deste alcalóide foi favorecida pela organização estrutural que caracteriza o cultivo *in vitro* de partes aéreas (“shoot culture”).

Recentemente, tem sido relatado que plântulas de *Chrysanthemum cinerariaefolium* regeneradas a partir de cultura de calos, produziram quantidade de piretrinas similar à planta cultivada no campo (Hitmi *et al.*, 1999). O efeito positivo da diferenciação organogênica na produção e acumulação de metabólitos secundários tem sido explicado pela formação *in vitro* de estruturas especializadas tais como tricomas glandulares e canais secretores internos (Zito *et al.*, 1994, citado por Hitmi *et al.*, 1999).

## OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivos:

. Estabelecer o protocolo de cultivo *in vitro* de *B. tridentata* e *B. dracunculifolia*, visando a micropropagação clonal para obtenção de um banco de plantas homogêneas para utilização em estudos posteriores.

. Investigar os efeitos da variação da fonte de nitrogênio, do pH inicial e da concentração dos principais macronutrientes do meio de cultivo, no crescimento *in vitro* destas espécies.

. Estudar as características anatômicas e histoquímicas de folhas e ápices caulinares, com ênfase nos tricomas glandulares, em *B. tridentata* cultivada em casa de vegetação, clone cultivado *in vitro* e clone aclimatado.

. Determinar a densidade (número de tricomas/mm<sup>2</sup>) de tricomas glandulares e tricomas não glandulares em *B. tridentata* cultivada em casa de vegetação, clone cultivado *in vitro* e clone aclimatado.

. Avaliar os efeitos de fatores ambientais (do microambiente), nutricionais e fitohormonais: a) na diferenciação de estruturas da folha e ápices caulinares, com ênfase na morfologia e características histoquímicas dos tricomas glandulares; b) na densidade dos tricomas glandulares em clone de *B. tridentata* cultivado *in vitro*.

## **CAPÍTULO I**

# **MICROPROPAGAÇÃO DE ESPÉCIES NATIVAS DE *Baccharis*: OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS.**

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer o protocolo de micropropagação das espécies nativas *B. tridentata* e *B. dracunculifolia*, via ápices caulinares, visando a propagação clonal para a formação de um banco de plantas homogêneas. A micropropagação permite produzir um grande número de plantas, idênticas à planta mãe, em curto período de tempo, contribuindo para a preservação destas espécies. As dificuldades relacionadas com a oxidação dos explantes de *B. tridentata*, foram superadas com a adição de carvão ativado ao meio de cultura e a ausência de luz nos cinco dias iniciais, após a inoculação. Para a espécie *B. dracunculifolia*, todos os procedimentos adotados para contornar a oxidação foram infrutíferos, impedindo o estabelecimento do cultivo *in vitro* via ápices caulinares, tendo o mesmo sido viabilizado através da germinação de sementes. No entanto, esta espécie mostrou um comportamento fortemente recalcitrante ao cultivo *in vitro*, impedindo a continuidade dos experimentos. O crescimento (altura do eixo caulinar, massa de matéria seca de raízes e partes aéreas) *in vitro* de *B. tridentata* foi favorecido pelo meio MS básico, sendo este o meio utilizado na micropropagação desta espécie. O enraizamento ocorreu, no mesmo meio, sem a utilização de fitorreguladores, possibilitando a formação de um banco de plantas homogêneas. A aclimação ocorreu com 80 % de sobrevivência das plantas, sendo este resultado atribuído às características próprias da espécie e ao pré-tratamento (diminuição progressiva da umidade interna) a que as plantas foram submetidas *in vitro*.

## 1. INTRODUÇÃO

Espécies nativas têm despertado grande interesse devido ao potencial econômico que apresentam, seja como fonte de princípios ativos utilizáveis pela indústria farmacêutica e de cosméticos, seja como plantas ornamentais, entre outras aplicações.

A micropropagação de plantas potencialmente úteis é importante, já que permite a obtenção de um número muito grande de plantas a partir de um único indivíduo, em curto período de tempo e ocupando espaço físico reduzido. Esta técnica apresenta grande utilidade no caso de plantas que não são facilmente propagadas pelas práticas convencionais (Hu & Wang, 1983; França, 1999), entretanto, mesmo para aquelas que não apresentam dificuldades, a micropropagação pode aumentar substancialmente a taxa de multiplicação (Murashige, 1974). Outra aplicação da micropropagação refere-se a conservação de germoplasma *in vitro*, especialmente para espécies propagadas vegetativamente ou para o caso de haver dificuldades na conservação de sementes. Além disso, a troca de germoplasma por meio de culturas *in vitro* permite um intercâmbio nacional e/ou internacional, com maior controle fitossanitário (Ferreira *et al.*1998).

Ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados são os explantes mais indicados na propagação clonal *in vitro*, pois eles possuem determinação para o crescimento vegetativo e em meio de cultivo adequado, irão se desenvolver naturalmente em plantas sem a passagem pela fase de calo (Grattapaglia & Machado, 1998). Uma das vantagens da cultura de ápices caulinares é a manutenção da identidade do genótipo propagado, em virtude das células do meristema apresentarem maior estabilidade genética (Murashige, 1974; Hu & Wang, 1983). A produção de plantas que são idênticas à planta matriz permite a perpetuação de características desejáveis, sendo extremamente importante no caso de espécies dióicas, quando

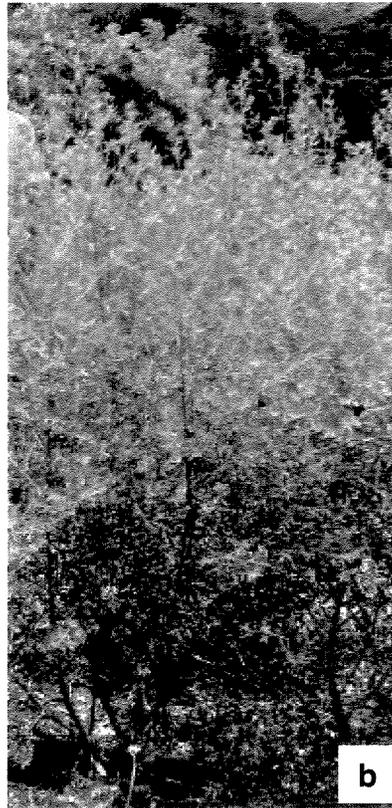
plantas femininas ou masculinas são mais valorizadas comercialmente (Bhojwani & Razdan, 1983).

Vários fatores relacionados à planta fornecedora do explante, às características e manipulação do explante, e às condições gerais de cultivo influenciam a micropropagação e devem ser otimizados. Um problema que dificulta o estabelecimento do cultivo *in vitro* de várias espécies é a oxidação de compostos fenólicos. Muitas plantas são ricas em compostos polifenólicos que são liberados durante a excisão do explante e oxidados pelas polifenoloxidasas. Os produtos da oxidação são tóxicos podendo comprometer ou inviabilizar o desenvolvimento do explante. Dentre os procedimentos utilizados para reduzir a oxidação, a lixiviação do explante antes da inoculação e o uso de substâncias antioxidantes durante a excisão do explante e no meio de cultivo têm se mostrado efetivos. Desde que cada espécie apresenta características únicas, o sucesso da micropropagação depende do estabelecimento de protocolos que atendam as necessidades específicas da planta em estudo (Hu & Wang, 1983; Grattapaglia & Machado, 1998).

*B. tridentata* Vahl e *B. dracunculifolia* DC são plantas dióicas, aromáticas, pertencentes a um gênero muito interessante do ponto de vista químico, biológico e etnofarmacológico.

A presença do sesquiterpeno nerolidol no óleo essencial de *B. tridentata* e *B. dracunculifolia* (Ferracini *et al.*, 1996), aliado às recentes descobertas do efeito inibitório deste composto no crescimento de *Plasmodium falciparum* (Lopes *et al.*, 1999; Macedo *et al.*, 2000), o mais perigoso agente causador da malária, qualifica estas duas espécies como potencialmente úteis. Além disso, a ocorrência natural de *B. tridentata* (subarbusto de 0,5-1,0 m de altura) em campos de altitude do Planalto do Itatiaia e de *B. dracunculifolia* (arbusto de 2,0 – 3,0 m de altura) nas bordas da Mata de Santa Genebra (Campinas), assim como em outras áreas abertas, sujeitas a freqüentes incêndios, justificam os esforços para o

estabelecimento da micropropagação no sentido de contribuir para a preservação deste valioso patrimônio genético.



**Figura 1.** a: *Baccharis tridentata* crescida no Planalto do Itatiaia, à 2400 metros; b, c: *B. dracunculifolia* cultivada no canteiro do Depto. Fisiologia Vegetal/IB/Unicamp.



## 2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer e otimizar o cultivo *in vitro* de *B. tridentata* e *B. dracunculifolia*, através de ápices caulinares, e a multiplicação clonal para obtenção de um banco de plantas homogêneas, assim como promover a aclimação das plantas micropropagadas ao ambiente de casa de vegetação.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL BOTÂNICO

##### a) *B. tridentata*

Mudas de *B. tridentata* (fig.1) foram coletadas em maio/2000 no Parque Nacional de Itatiaia (20°25'S,42°20'W), no km 14 da estrada que dá acesso ao Pico das Agulhas Negras, a cerca de 2400m de altitude. Foram cultivadas em canteiro e casa de vegetação do Departamento de Fisiologia Vegetal/Instituto de Biologia/UNICAMP, a partir dessa data. Exsicata do material foi depositada no herbário da UNICAMP sob n° UEC 124.784.

##### b) *B. dracunculifolia*

Mudas de *B. dracunculifolia* foram coletadas em setembro/2000 na Mata de Santa Genebra-Campinas (22°44'45''S, 47°06'33''W) através de um projeto desenvolvido com a Fundação José Pedro de Oliveira. Foram transplantadas para o canteiro do DFV/IB/UNICAMP e cultivadas no período de Setembro/2000 a Setembro/2002 (fig.1). Nestas condições floresceram anualmente, no período de abril a agosto, permitindo assim, identificar-se plantas femininas e masculinas. Progênie destas plantas cultivadas em canteiro foram estabelecidas em casa de vegetação através da germinação de sementes. Exsicata do material foi depositada no herbário da UNICAMP.

#### 3.2 CULTIVO *IN VITRO*

##### 3.2.1 ESTABELECIMENTO DO CULTIVO *IN VITRO*

##### a) Através de ápices caulinares:

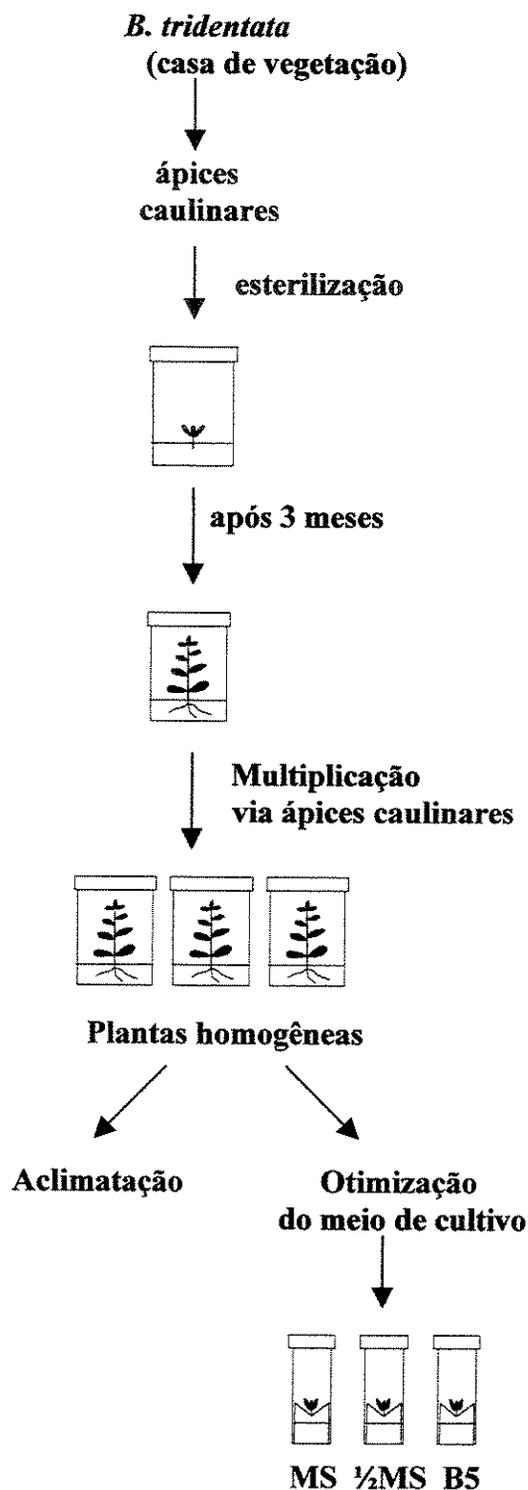
Da planta cultivada em casa de vegetação (*B. tridentata*) e em canteiro (*B. dracunculifolia*), foram coletados ápices caulinares de uma única planta. Após lixiviação em água corrente durante 3 horas, os ápices foram tratados com solução fungicida Benlate

(Benomyl) 1% p/v durante (10-30 minutos) e hipoclorito de sódio à 1% v/v durante (10-30 minutos), após o qual foram lavados 3 vezes com água destilada. A excisão final para isolamento dos explantes (cerca de 1,2 cm), foi feita em placa de Petri contendo solução antioxidante (ácido cítrico, 150mg/L; ácido ascórbico, 150mg/L; e cisteína, 2mg/L).

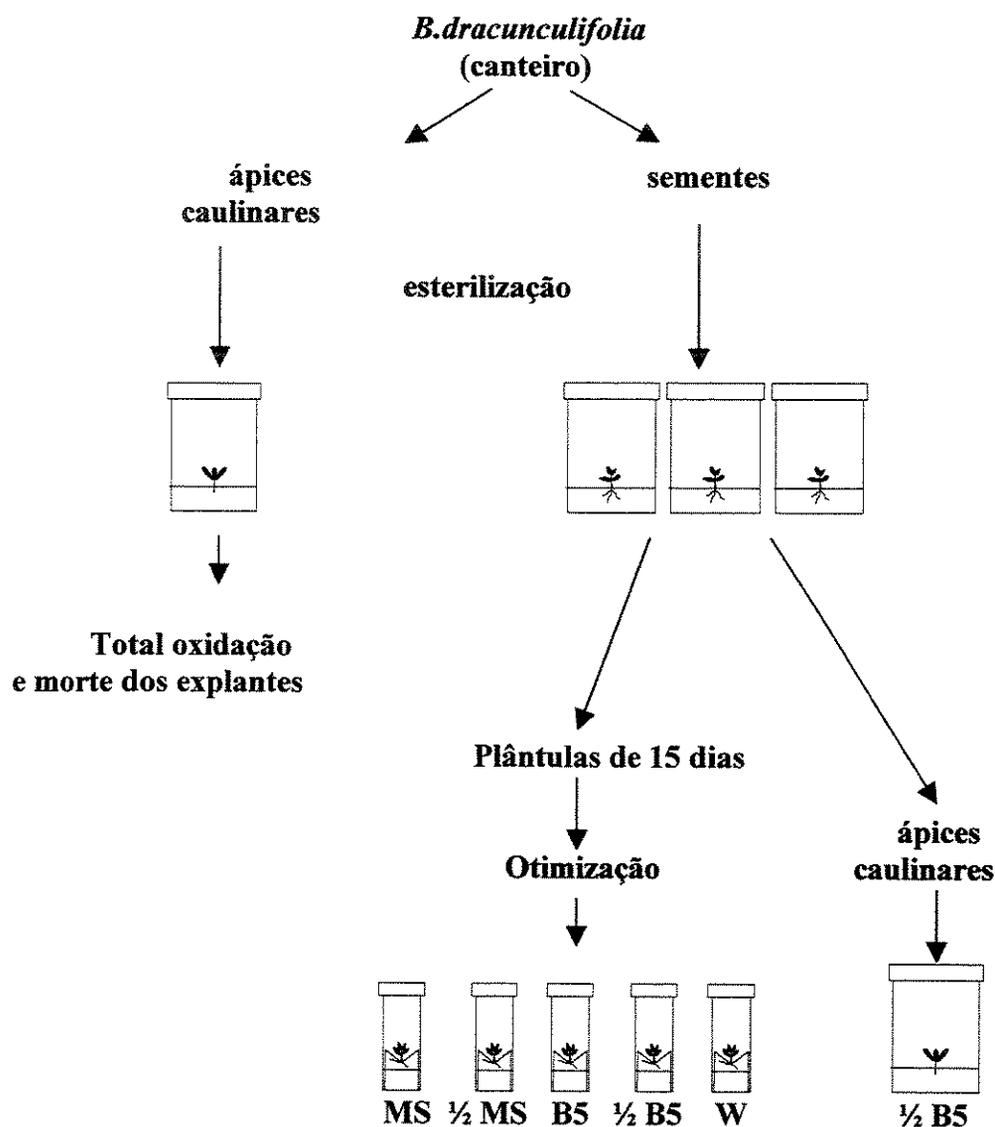
Os ápices caulinares foram inoculados individualmente, em tubos de fundo chato (8cm de altura e 2cm de diâmetro), contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), solidificado com 0,7% de ágar, e com substâncias antioxidantes (cisteína 25mg/L; PVP: polivinilpirrolidona 10g/L) e carvão ativado, a 1% (p/v) . Durante os 5 primeiros dias foram mantidos no escuro, à 25-27°C, após os quais foram cultivados em fotoperíodo de 16 horas, sempre à mesma temperatura. Os explantes foram transferidos para meios novos após 5 dias (fig. 2 e 3).

#### **b) Através da germinação de sementes**

Sementes de *B. dracunculifolia* coletadas em junho de 2001 de plantas cultivadas no canteiro do IB, foram esterilizadas com solução fungicida Benlate (Benomyl) 1% (p/v), durante 10 minutos e hipoclorito de sódio 1% durante 10 minutos. Sucessivas lavagens com água destilada foram realizadas e após estarem secas foram inoculadas em frascos autoclaváveis (9,2cm de altura e 4,5cm de diâmetro), contendo meio MS solidificado com 0,7% de ágar. Cada frasco recebeu 10 sementes e permaneceu à temperatura de 25°-27°C, sob duas condições de luminosidade: fotoperíodo de 16 horas e escuro contínuo. Foram feitas 5 repetições por tratamento (fig. 3).



**Figura 2.** Esquema do estabelecimento da micropropagação de *B.tridentata* a partir de ápices caulinares de uma única planta . O meio para a inoculação inicial do explante e para a propagação clonal foi MS (Murashige & Skoog, 1962), pH 5,8. Os meios testados na otimização foram: MS, ½ MS, e B5 (Gamborg *et al.*, 1968). As condições de cultivo foram fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25-27°C.



**Figura 3.** Esquema do estabelecimento do cultivo *in vitro* de *B. dracunculifolia* em meio MS (Murashige & Skoog, 1962). Os meios testados na otimização foram: MS na concentração original e diluída pela metade (1/2 MS), B5 (Gamborg *et al.*, 1968) na concentração original e diluída pela metade (1/2 B5) e meio W (White, 1943). As condições de cultivo foram fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25-27°C.

### 3.2.2. OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO SALINA DOS MEIOS DE CULTIVO:

#### a) *B. tridentata*

Ápices caulinares de *B. tridentata* cultivadas *in vitro* foram inoculados em meios líquidos sobre ponte de papel. Os meios testados foram: **Tratamento 1-** Composição original do meio MS (Murashige & Skoog, 1962); **Tratamento 2-** Meio MS com as concentrações reduzidas à metade ( $\frac{1}{2}$  MS); **Tratamento 3-** Meio B5 (Gamborg *et al.*1968). Foram realizadas 5 repetições por tratamento. O crescimento foi avaliado após 31 dias de cultivo.

#### b) *B. dracunculifolia*

Plântulas de 15 dias (fig.3), obtidas a partir da germinação *in vitro* foram inoculadas em meios líquidos, sobre ponte de papel. Os meios testados foram: **Tratamento 1-** Composição original do meio MS; **Tratamento 2-** Meio MS com as concentrações reduzidas à metade ( $\frac{1}{2}$  MS); **Tratamento 3-** Meio B5; **Tratamento 4-** B5 com as concentrações reduzidas à metade ( $\frac{1}{2}$  B5); **Tratamento 5-** Meio W (White,1943). Foram realizadas 14 repetições por tratamento. O crescimento foi avaliado após 60 dias de cultivo.

O cultivo foi realizado em câmara de crescimento, com temperatura de 25-27°C e fotoperíodo de 16 horas. Os parâmetros de crescimento avaliados foram: comprimento do eixo principal da parte aérea (cm) e Massa de matéria seca (mg) de partes aéreas e raízes. Para obtenção do peso seco o material foi colocado em estufa à 70°C, durante 48 horas.

### 3.3. ACLIMATAÇÃO:

Ápices caulinares de *B. tridentata* cultivadas *in vitro*, foram inoculados em meio MS líquido, com 3% de sacarose, pH 5,8; utilizando como suporte vermiculita autoclavada, e cultivadas sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25-27°C, durante 4 semanas. A partir da terceira semana, foram feitas perfurações na vedação de PVC, diminuindo gradativamente a

umidade no interior do frasco e iniciando o processo de aclimação. No final da quarta semana, plantas apresentando raízes vigorosas, foram transplantadas para bandejas contendo vermiculita autoclavada, e mantidas durante uma semana em umidificador, em casa de vegetação. Após 2 semanas de cultivo *ex-vitro* foram transferidas para vasos individualizados permanecendo em bancada com aspersão automática. Durante este período (10 dias), as plantas foram irrigadas 3x/semana com solução nutritiva de Hoagland & Arnon, (1950), após o qual foram transferidas para vasos contendo mistura de terra vegetal, areia e vermiculita (7:2:1).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. ESTABELECIMENTO DO CULTIVO *IN VITRO*

A assepsia e esterilização do material antes da inoculação é de grande importância, já que a contaminação durante esta fase impede o desenvolvimento da cultura. Em nosso experimento, o fato dos explantes serem oriundos de plantas matrizes cultivadas em canteiro diminuiu este problema. No entanto, os procedimentos normalmente realizados (imersão em solução fungicida de Benomyl 1% e em solução de hipoclorito de sódio 1%) foram efetivos somente quando se aumentou o tempo de imersão para 30 minutos (fungicida) e 20 minutos (hipoclorito), para as duas espécies. Para preservar o explante a ser inoculado, a esterilização foi realizada em material com dimensões maiores, sendo que a excisão final do explante nas dimensões adequadas (cerca de 1,2cm de altura) foi realizada apenas no momento da inoculação.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), em algumas espécies é comum durante a fase de isolamento dos explantes, a ocorrência de oxidação de compostos fenólicos liberados pelas células danificadas com o corte, que se difundem rapidamente pelo meio de cultura e são tóxicos ao explante. Em nosso experimento, os explantes das duas espécies apresentaram forte oxidação (caracterizada pelo escurecimento dos explantes e do meio), apesar da adoção de alguns procedimentos, como lixiviação em água corrente e utilização de substâncias anti-oxidantes no momento da excisão e também como constituinte do meio de cultivo.

Para a espécie *B. tridentata*, a oxidação foi superada graças à adição de carvão ativado ao meio de cultivo e à ausência de luz a que os explantes foram submetidos nos primeiros 5 dias após a inoculação. Já para a espécie *B. dracunculifolia*, nenhuma das medidas adotadas

foi bem sucedida, resultando na morte dos ápices caulinares e inviabilizando a utilização deste tipo de explante.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a ausência de luz ou a baixa intensidade luminosa limitaria a ativação de enzimas envolvidas na oxidação dos compostos fenólicos, enquanto o carvão ativado adicionado ao meio de cultura poderia adsorver compostos tóxicos, contribuindo para a sobrevivência dos explantes. Alguns autores (Hildebrandt & Harney, 1988; Marks & Simpson, 1990) relataram aumento do número de explantes viáveis com a diminuição da intensidade luminosa durante o pré-tratamento da planta doadora dos explantes.

Os resultados obtidos com *B. dracunculifolia*, confirmaram a dificuldade em estabelecer o cultivo *in vitro* de algumas espécies, experimentada por diversos outros autores, evidenciando a necessidade de procedimentos diferenciados, como por exemplo, o pré-tratamento das plantas matrizes, que poderão ser adotados em tentativas futuras para o estabelecimento do cultivo *in vitro* desta espécie. Já para *B. tridentata*, a produção de compostos fenólicos provavelmente foi menor, decorrente de características específicas desta espécie, ou do estado fisiológico da planta matriz, no momento da coleta dos explantes. Assim sendo, a lixiviação a que os explantes foram submetidos, o carvão ativado e a ausência de luz, foram suficientes para controlar a oxidação e garantir a sobrevivência dos explantes.

Após o período inicial crítico, os explantes viáveis de *B. tridentata* foram transferidos para meio MS, recém preparado, e mantidos sob fotoperíodo de 16 horas, à 25-27°C. Durante um período de 3 meses os explantes apresentaram crescimento muito lento, após o qual, enraizaram, cresceram e foram multiplicados via ápice caulinar, produzindo um número adequado de plantas homogêneas.

Quanto à espécie *B. dracunculifolia*, as tentativas frustradas de controle da oxidação dos ápices caulinares, levou-nos a optar pelo estabelecimento do cultivo *in vitro* desta espécie através da germinação de sementes. Após 10 dias da inoculação, foi observada 50% de

germinação das sementes que permaneceram sob fotoperíodo de 16 horas. As que ficaram no escuro, apresentaram 2% de germinação, somente após 20 dias. Estes resultados permitiram caracterizar as sementes de *B. dracunculifolia* como fotoblásticas positivas.

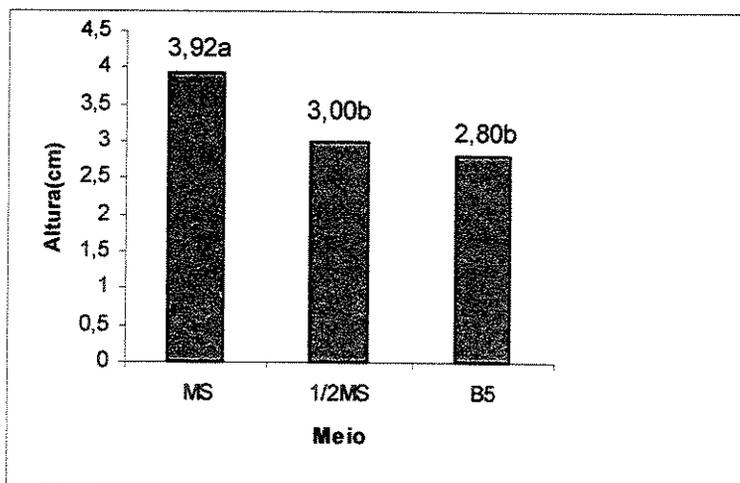
#### 4. 2. OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO *IN VITRO* (MEIOS DE CULTURA)

Em geral, a composição salina do meio MS (Murashige & Skoog, 1974) é satisfatória para o crescimento adequado de muitas espécies de plantas. No entanto, para algumas espécies, o nível dos sais é tóxico, ou desnecessariamente alto (Bhojwani & Razsan, 1983). O estabelecimento do cultivo *in vitro* de *B. tridentata* foi bem sucedido quando se utilizou o meio MS, promovendo inclusive o enraizamento dos explantes. Com o objetivo de otimizar o meio de cultivo para esta espécie, inclusive para verificar se a concentração original do meio MS era necessária, foi realizado este experimento. Conforme verificamos na fig.4, o crescimento do eixo caulinar de *B. tridentata* diminuiu significativamente no meio ½ MS e B5. Igualmente a matéria seca de partes aéreas e raízes foi afetada, como podemos verificar na Tabela 1. Estes resultados confirmam o meio MS como o mais adequado ao cultivo *in vitro* desta espécie, principalmente porque na propagação clonal, plantas mais desenvolvidas poderão fornecer maior número de explantes. Parece existir uma correlação entre o habitat natural desta espécie, descrito como rico em húmus (Camerick & Werger, 1981) e o melhor resultado obtido no meio MS, rico em nutrientes, utilizado *in vitro*.

O enraizamento de partes aéreas *in vitro* é uma etapa importante na micropropagação. Plantas herbáceas enraizam com certa facilidade, porém o mesmo não ocorre com as espécies lenhosas. É bem conhecido, do clássico trabalho de Skoog & Miller (1957, citado por

Murashige, 1974) a necessidade de alta concentração de auxina e baixa de citocinina, para ocorrer o enraizamento.

Ápices caulinares do clone de *B. tridentata* cultivado *in vitro*, iniciaram a formação de raízes após 1 semana da inoculação nos três meios, sem a adição de fitorreguladores. Segundo alguns autores, as folhas jovens dos ápices caulinares constituem rica fonte de auxinas, não sendo necessária a sua adição no cultivo de muitas espécies (Grattapaglia & Machado, 1998). Além disso, a citocinina endógena pode ser suficientemente baixa, garantindo a razão adequada destes fitorreguladores para o enraizamento das plantas.



**Figura 4.** Altura do eixo caulinar (cm) de *B. tridentata* após 31 dias de cultivo *in vitro* sob fotoperíodo de 16 h/ 25-27°C. Os dados constituem médias de 5 repetições. Valores seguidos por letras distintas diferem significativamente (Tuckey 5%;  $P < 0,05$ ).

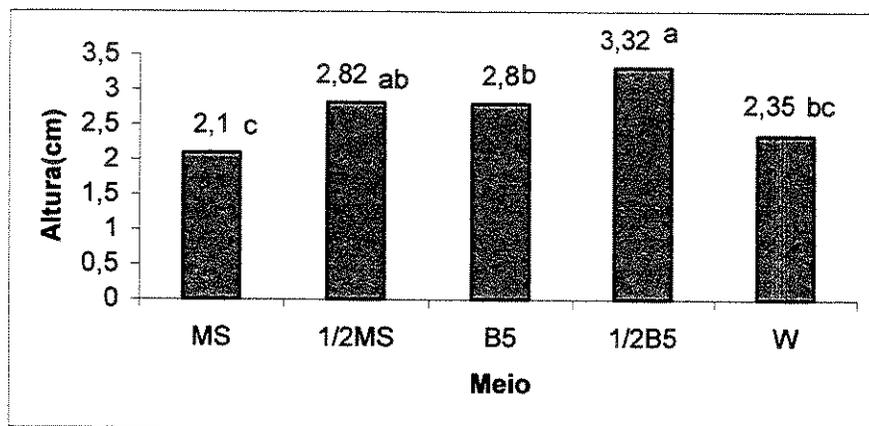
	MS	½ MS	B5
Parte aérea	12,290 a	8,980 b	9,604 b
Raízes	3,540 A	2,504 B	2,420 B

**Tabela 1.** Massa de matéria seca de partes aéreas e raízes (mg) de *B. tridentata* após 30 dias de cultivo nos diferentes meios, sob fotoperíodo de 16 h/ 25±1°C. Dados representam médias de 5 repetições/tratamento. Em uma mesma linha, médias seguidas por letras distintas indicam diferenças significativas (Tuckey 5%;  $P < 0,05$ ).

Nos estudos realizados sobre o crescimento *in vitro* de plântulas de *B. dracunculifolia* em diferentes meios, a composição do meio ½ MS e do meio B5 (independente da concentração testada) favoreceu significativamente o crescimento em altura, independentemente da concentração testada, em relação ao meio MS padrão (fig.5). Com relação a massa de matéria seca, o meio White (que apresenta menor concentração salina e ausência de amônia), apresentou valores significativamente maiores, como pode ser observado na Tabela 2. Os resultados de massa seca de raízes obtidos com o meio White, sugerem que o crescimento das raízes pode ter sido favorecido pelo baixo suprimento de nitrogênio, o que também foi observado por Almeida & Shepherd (1999) no cultivo *in vitro* da planta nativa *Sinningia allagophylla*.

Considerando a ocorrência de necrose apical no meio White e os valores de crescimento em altura, matéria seca e vigor das plantas, os resultados sugerem que o cultivo *in vitro* das plântulas deve ser realizado em meios com concentrações mais diluídas (B5, ½ B5 e ½ MS).

Plântulas de *B. dracunculifolia* foram cultivadas e multiplicadas em meio ½ B5, via ápice caulinar, apresentando, no entanto, crescimento e enraizamento lentos, além de plantas pouco vigorosas, sugerindo comportamento recalcitrante ao cultivo *in vitro*. Para o cultivo *in vitro* de *B. dracunculifolia* os meios básicos padrões e suas diluições não foram adequados, evidenciando a necessidade de um meio de cultivo personalizado, com composição de nutrientes específica para esta espécie.



**Figura 5.** Altura (cm) de plântulas de *B. dracunculifolia*, após 60 dias de cultivo *in vitro*, à 25-27°C, sob fotoperíodo de 16 horas. Dados representam médias de 14 repetições/tratamento. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente (Tuckey 0.1%, P<0.001)

	MS	½ MS	B5	½ B5	W
P. aérea	2,01b	3,229 ab	2,891 bc	3,011 abc	4,229 a
Raízes	0,254 B	0,541 B	0,526 B	0,714 B	1,666 A

**Tabela 2.** Massa de matéria seca (mg) de partes aéreas e raízes de plântulas de *B. dracunculifolia*, após 60 dias de cultivo *in vitro*. Dados representam médias 14 repetições/tratamento. Médias seguidas por letras distintas indicam diferenças significativas (Tuckey 0,1%; P<0,001).

### 4.3. ACLIMATAÇÃO

A etapa do transplantio envolve a transferência da planta da condição *in vitro* para casa de vegetação, onde é submetida a uma fase de aclimatação. Esta passagem é crítica e em alguns casos pode ser um fator limitante para a micropropagação. Para *B. tridentata*, a transferência para a condição *ex-vitro* (fig.6), em casa de vegetação resultou na sobrevivência de 80% das plantas. A qualidade das plantas transplantadas é um fator importante neste processo e certamente, o vigor exibido pelas plantas cultivadas *in vitro*, com a formação de raízes curtas e numerosas, contribuíram para o sucesso da aclimatação desta espécie. Além disso, o cultivo dos ápices caulinares em meio líquido utilizando como suporte vermiculita, em substituição ao agar, favoreceu o transplantio, pois segundo Werbrouck & Debergh (1994), resíduos de ágar nas raízes podem servir de substrato para o crescimento de patógenos durante esta fase.

A perda de água é um dos principais fatores de risco no processo de aclimatação, ocorrendo nas primeiras horas após a transferência para casa de vegetação. Pré-tratamentos visando diminuir a umidade relativa no frasco de cultivo podem ser aplicados para aumentar a sobrevivência (Johansson *et al.*,1992). Segundo alguns autores estes procedimentos contribuem para a formação de uma cutícula mais espessa, diminuindo a evaporação cuticular quando no ambiente *ex-vitro* (Wardle *et al.*,1983).

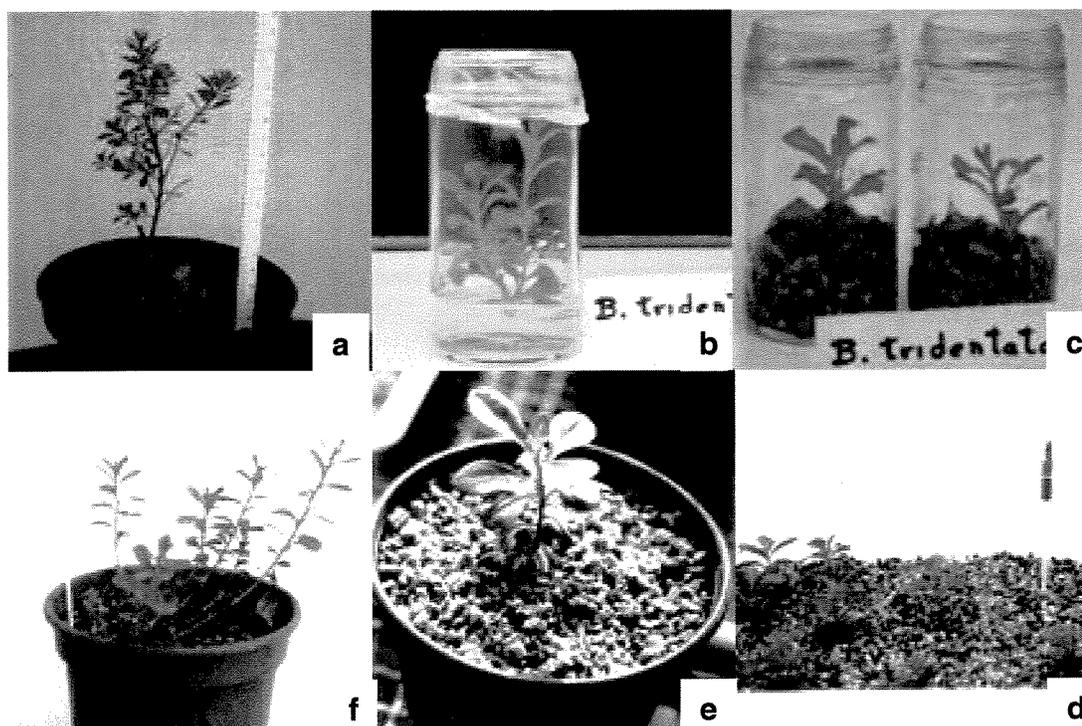
## 5. CONCLUSÕES:

. O cultivo *in vitro* e a micropropagação de *B. tridentata* foram possíveis a partir de ápices caulinares, em meio MS, sem a adição de fitorreguladores, permitindo o estabelecimento de um banco de plantas homogêneas nas quais as características da planta matriz foram mantidas.

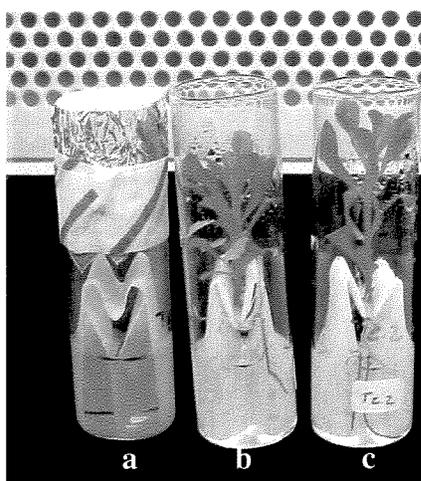
. Os procedimentos adotados neste experimento visando proporcionar uma mudança gradativa na umidade durante o transplântio de clone de *B. tridentata* cultivado *in vitro*, foram eficientes e garantiram a sobrevivência de 80% das plantas, tornando, portanto, a micropropagação um método eficiente para obtenção de plantas homogêneas, em curto período de tempo.

. *B. dracunculifolia* apresentou comportamento recalcitrante ao cultivo *in vitro*, não tendo se desenvolvido eficientemente nas condições testadas. Considerando a importância desta espécie, estudos futuros poderão ser realizados visando o estabelecimento de um meio de cultivo personalizado.

. A obtenção de culturas axênicas de *B. tridentata* em meio líquido, abre perspectivas para a realização de ensaios biológicos utilizando microorganismos conhecidos, visando a produção de compostos secundários. Outra possibilidade é a utilização dos meios líquidos após o crescimento de *B. tridentata*, em ensaios alelopáticos *in vitro* com outras espécies medicinais.



**Figura I.6.** Esquema de micropropagação de *B. tridentata* (sequência das fases no sentido horário): (a) Planta matriz em casa de vegetação, (b) Planta micropropagada em meio MS básico, (c) Pré-tratamento antes do transplante para condição *ex-vitro*, (d) plantas em umidificador, (e) em vaso com vermiculita, (f) planta aclimatada com 4 meses de cultivo *ex-vitro*.



**Figura II. 3.** *B.tridentata* cultivada em meio líquido MS (b, c). Visualização da alteração dos valores de pH através da mudança de cor do indicador verde de bromocresol, após 24 dias de cultivo *in vitro* sob fotoperíodo de 16 horas, à temperatura 25-27°C. (a) controle: pH 5,8. (b) e (c) pH aproximado de 3,6.



## **CAPÍTULO II**

**EFEITO DA VARIAÇÃO DO pH INICIAL, DA FONTE DE NITROGÊNIO E DA  
CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES DO MEIO DE CULTIVO, NO  
CRESCIMENTO *in vitro* DE CLONE DE *B. tridentata***



## RESUMO

Estudos fisiológicos com espécies nativas são importantes pois contribuem para a compreensão de mecanismos de adaptação aos habitats específicos, assim como para a preservação destas plantas. Foram realizados experimentos sobre o efeito da variação do pH inicial, da fonte e concentração de nitrogênio, da concentração dos principais macronutrientes no meio de cultivo de clone de *B. tridentata* cultivado *in vitro*. Foi possível verificar que independente do pH inicial (4,0-6,5), o crescimento das plantas após 31 dias, resultou em acidificação do meio (pH 3,6). Além disso, o crescimento neste pH, por um período adicional de 31 dias, sem apresentar sintomas de deficiência ou toxicidade, sugerem mecanismos de adaptação à substratos ácidos. A fonte mista de nitrogênio ( $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ ) favoreceu significativamente o crescimento das plantas, quando comparada com nitrato ou amônia, fornecidos isoladamente. Além disso, na concentração original, a fonte mista foi a única que favoreceu a formação de raízes. A diluição para  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{1}{4}$  diminuiu proporcionalmente o crescimento das plantas cultivadas *in vitro*, evidenciando o forte efeito do nitrogênio no crescimento desta espécie. O meio com amônia como única fonte produziu plantas debilitadas, com sintomas de deficiência nutricional. Já no meio com nitrato como única fonte, as plantas estavam saudáveis. No entanto, somente na diluição  $\frac{1}{4}$ , o crescimento neste meio foi similar ao da fonte mista, com relação à massa seca das raízes. A variação dos macronutrientes revelou que a diminuição da concentração de cálcio para  $\frac{1}{4}$ , produziu os mesmos resultados de crescimento em altura que a concentração original, enquanto a diminuição da concentração de magnésio aumentou a massa seca das raízes. Estes resultados evidenciaram a importância de estabelecer meios de cultivo específicos para cada espécie, evitando a utilização de concentrações de nutrientes desnecessárias.

## 1.INTRODUÇÃO

Sabe-se que o pH do solo interfere no crescimento das plantas, inclusive na distribuição de muitas espécies nativas, seja através de efeitos diretos dos íons hidrogênio ou hidroxila, seja por alterar a solubilidade de vários nutrientes minerais (Islam *et al.*,1980). Além disso, os solos ácidos diferem dos neutros e alcalinos, entre outros aspectos, quanto à forma de nitrogênio disponível para as plantas, sendo esta em geral o íon amônio. A razão para que isto ocorra é que em solos com pH abaixo de 5,0, a atividade das bactérias nitrificantes é muito reduzida, resultando em nitrificação baixa ou nula (Gigon & Rorison,1972). As fontes e concentrações de nitrogênio são de grande importância no crescimento e diferenciação dos tecidos cultivados *in vitro*.

Em geral a combinação de amônio e nitrato estimula o crescimento de várias espécies de plantas (Lewis & Chadwick, 1983; Kirby *et al.*, 1987), sendo que o mais importante parece ser a razão entre os dois íons (Caldas *et al.*, 1998). No entanto, tem sido relatado que o crescimento similar ao produzido pela mistura dos dois íons, pode ser sustentado com nitrato como única fonte (Marques *et al.*, 1998). Um problema da nutrição com nitrato, isoladamente, deve-se ao fato da sua absorção resultar em aumento do pH do substrato (Kirby *et al.*, 1987). Além disso, a redução do nitrato é um processo energeticamente caro (Raab & Terry, 1994), e considerando que o crescimento *in vitro* é quase totalmente heterotrófico, isto poderia constituir uma limitação. Já a nutrição com amônio, em geral, resulta em crescimento menor (Salsac *et al.*, 1987). Além disso, altas concentrações deste íon podem ser tóxicas aos tecidos vegetais. Segundo Kirby *et al.* (1983), tecidos cultivados *in vitro* podem responder melhor às formas de nitrogênio as quais a planta está exposta no habitat natural.

O Parque Nacional de Itatiaia está situado na serra da Mantiqueira, na fronteira dos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro. A vegetação é característica de campos

de altitude, com espécies de Poaceae e Cyperaceae formando uma matriz principal e pequenos arbustos entre as pedras, além de uma grande diversidade de espécies de plantas encontradas nas superfícies das rochas (Camerick & Werger, 1981). As chuvas ácidas, comuns nesta região, produzem nas rochas microcrateras que dão origem aos alvéolos rochosos. No interior destes alvéolos os líquens se desenvolvem e contribuem para o seu alargamento através da ação de ácidos liquênicos produzidos. O acúmulo de matéria orgânica nestes locais permite o crescimento de muitas espécies de plantas (Martinelli *et al.*,1996). Os solos são escuros, rochosos, ricos em húmus e, portanto, acídicos, sendo que o conteúdo de alumínio é relativamente alto (0,3-3,7 mE/100ml), enquanto cálcio e magnésio são baixos (0,5-2,0 mE/100ml) (Camerick & Werger, 1981).

Dentre as principais famílias que ocorrem na parte alta do Parque Nacional de Itatiaia, destaca-se a família Asteraceae com 96 espécies, muitas das quais pertencem ao gênero *Baccharis*. O patrimônio genético desta região tem sido ameaçado e vem sofrendo contínuo processo de degradação, seja pelas queimadas recorrentes, como também pela utilização dos campos como pastagens e destruição do cinturão de matas ao redor do parque (Martinelli *et al.* 1996). Espécimes de *B. tridentata* ocorrem nos alvéolos rochosos do planalto do Itatiaia, a cerca de 2400 metros de altitude. São plantas dióicas, semi-arbustivas, com cerca de 30-50 cm de altura (Barroso, 1976). Esta espécie respondeu favoravelmente ao cultivo *in vitro*, tendo sido desenvolvido um protocolo de micropropagação específico (Kajiki & Shepherd, dados apresentados no capítulo I), que será utilizado no presente trabalho. A utilização de meios líquidos favorecem a total disponibilidade dos nutrientes sem o estabelecimento de gradientes de concentração durante o cultivo. Além disso permitem a visualização das alterações do pH, através da adição de um indicador apropriado.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos avaliar os efeitos da variação do pH inicial, de diferentes fontes de nitrogênio e da variação das concentrações dos macronutrientes do meio de cultivo, no crescimento *in vitro* de um clone de *B. tridentata*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL BOTÂNICO:

Plantas de *B. tridentata* foram obtidas através de multiplicação vegetativa *in vitro*, a partir do banco de plantas homogêneas estabelecido anteriormente. O meio de multiplicação foi MS, pH 5,8; 3% de sacarose e 2,5 g/L de Phytigel (Sigma), sem adição de fitorreguladores. A coleta dos explantes utilizados nos experimentos foi padronizada. Plantas de 31 dias, com aproximadamente 4,0 cm de altura, enraizadas, foram utilizadas como fonte de explantes para os experimentos.

#### 3.2. CONDIÇÃO EXPERIMENTAL:

As plantas foram mantidas em câmara de crescimento, à 25-27°C, sob fotoperíodo de 16 horas, tanto na obtenção das plantas doadoras dos explantes, como nos experimentos que se seguiram. Nos três experimentos realizados, explantes constituídos por ápices caulinares com 1,2 cm de altura e 3 folhas jovens, foram inoculados, em meio MS, em estado líquido, sobre suporte de papel de filtro Whatman nº1, em tubos de ensaio de fundo chato (8 cm de altura/2cm de diâmetro). A inoculação do explante foi realizada em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar. Em todos os tratamentos, o indicador verde de bromocresol (5mL.L<sup>-1</sup>) foi adicionado ao meio durante o seu preparo, permitindo a visualização da mudança dos valores de pH (fig.II.3). O controle do indicador foi preparado com água destilada com pH ajustado aos valores utilizados nos tratamentos, mais o indicador. O controle sobre o efeito do crescimento da planta na mudança do pH foi constituído pelo tratamento mantido sem o explante.

Os parâmetros de crescimento avaliados nos experimentos foram: Altura do eixo caulinar (cm) e Massa de matéria seca de partes aéreas e raízes (mg), obtida após o material vegetal ser colocado em estufa à 70°C, durante 48 horas.

### **3.3. EXPERIMENTOS**

#### **3.3.1. EFEITO DA VARIAÇÃO DOS VALORES DE pH INICIAL NO MEIO DE CULTIVO:**

Os explantes foram cultivados assepticamente em um gradiente de valores iniciais de pH, ajustados antes da autoclavagem (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 5,8; 6,0 e 6,5). O pH 5,8 foi considerado como o controle, pois é o valor mais comumente utilizado em cultura de tecidos vegetais. Cada tratamento foi realizado com dez repetições. Após 31 dias da inoculação dos explantes, 5 amostras foram coletadas aleatoriamente e avaliadas segundo os parâmetros citados. Após 62 dias, as amostras restantes foram avaliadas segundo os mesmos parâmetros.

#### **3.3.2. EFEITO DO NITROGÊNIO: VARIAÇÃO DA FONTE E CONCENTRAÇÃO.**

O meio MS constituiu o meio básico a partir do qual alteraram-se as fontes de nitrogênio, mantendo-se as concentrações dos demais nutrientes exatamente como no meio MS original. Todos os tratamentos foram balanceados, para manter constante o teor de nitrogênio total equivalente ao contido no Meio MS. Variou-se a fonte e não a quantidade de nitrogênio, sem causar a deficiência de outros macronutrientes como potássio, por exemplo, fornecido através de KCl (Tabela 1). Os tratamentos foram os seguintes: T1=  $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ ; T2=  $\text{NH}_4^+$ ; T3=  $\text{NO}_3^-$ . Os três tratamentos foram realizados na concentração original e diluídas para 1/2 e 1/4, com dez repetições cada. Após 31 dias de cultivo, cinco amostras foram

coletadas aleatoriamente e avaliadas segundo os parâmetros citados. Após 62 dias da inoculação, as amostras restantes foram avaliadas sob os mesmos parâmetros.

### **3.3.3. EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES**

O experimento foi delineado para avaliar os efeitos da diminuição, para  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{1}{4}$ , da concentração dos macronutrientes: N, Ca, Mg, P, K. O meio MS deu origem aos tratamentos, com cinco repetições cada. Para garantir que apenas o elemento a ser testado fosse alterado, houve, quando necessário a substituição dos sais normalmente utilizados no meio MS. Por exemplo, para testar os efeitos da diminuição do teor de nitrogênio,  $KNO_3$  foi substituído por  $NaNO_3$ , sendo acrescentado KCl como fonte de potássio (Tabela 2). Os explantes inoculados, foram avaliados após 31 dias de cultivo, segundo os parâmetros citados anteriormente.

### **3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise de variância (ANOVA) foi realizada através do programa estatístico SYSTAT 9 (SPSS Inc. 1998).

A comparação entre as médias (Teste de Tuckey) foi obtida através do programa VARPC, desenvolvido pelo Prof. Dr. Ladaslav Sodek, do Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp.

Sais (mg/L)	Composição*		
	T1	T2	T3
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,0	—	—
KNO <sub>3</sub>	1900,0	—	1900,0
NH <sub>4</sub> CL	—	3211,6	—
KCL	—	1400,9	—
NaNO <sub>3</sub>	—	—	3506,9

**Tabela 1** Composição das fontes de nitrogênio nos tratamentos: **T1** (fonte mista de N: NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>); **T2** (fonte única de N: NH<sub>4</sub><sup>+</sup>); **T3** (fonte única de N: NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

\*Composição elaborada de forma a manter constante o teor de N total do meio original MS (60 mM), sem haver alteração na concentração dos demais macronutrientes.

Sais	Composição*												
	MS		T1		T2		T3		T4		T5		
	mg/L	mM/L	(½) N		(½) Ca		(½) Mg		(½) P		(½) K		
		mg/L	mM/L	mg/L	mM/L	mg/L	mM/L	mg/L	mM/L	mg/L	mM/L	mg/L	mM/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20,6	825	10,3	1650	20,6	1650	20,6	1650	20,6	1650	20,6	
KNO <sub>3</sub>	1900	18,8	—		1900	18,8	1900	18,8	1900	18,8			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1,25	170	1,25	170	1,25	170	1,25	—				
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	3,0	440	3,0	220	1,5	440	3,0	440	3,0	440	3,0	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	1,5	370	1,5	370	1,5	185	0,75	370	1,5	370	1,5	
NaNO <sub>3</sub>	—		799	9,4	—		—		—		1598	18,8	
KCl	—		1401	18,8	—		—		93	1,25	747	10,02	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	—		—		—		—		75	0,625	150	1,25	

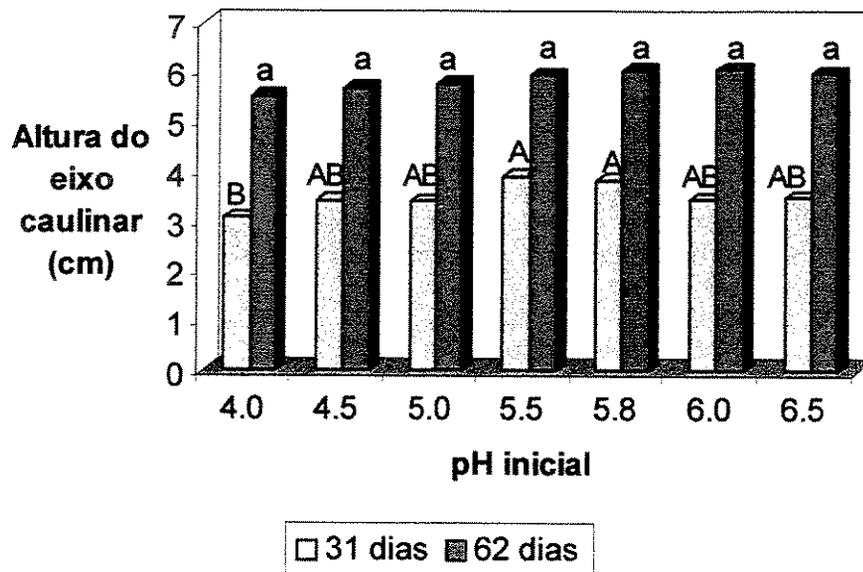
Tabela 2. Composição salina dos macronutrientes do meio MS básico (concentração original) e dos tratamentos: **T1** (concentração de N diluída para ½), **T2** (concentração Ca/2), **T3** (concentração Mg/2), **T4** (concentração do P/2) e **T5** (concentração de K/2).

\* Composição elaborada de forma a alterar apenas a concentração do elemento a ser testado, mantendo o teor dos demais nutrientes minerais igual à da composição original do meio MS.

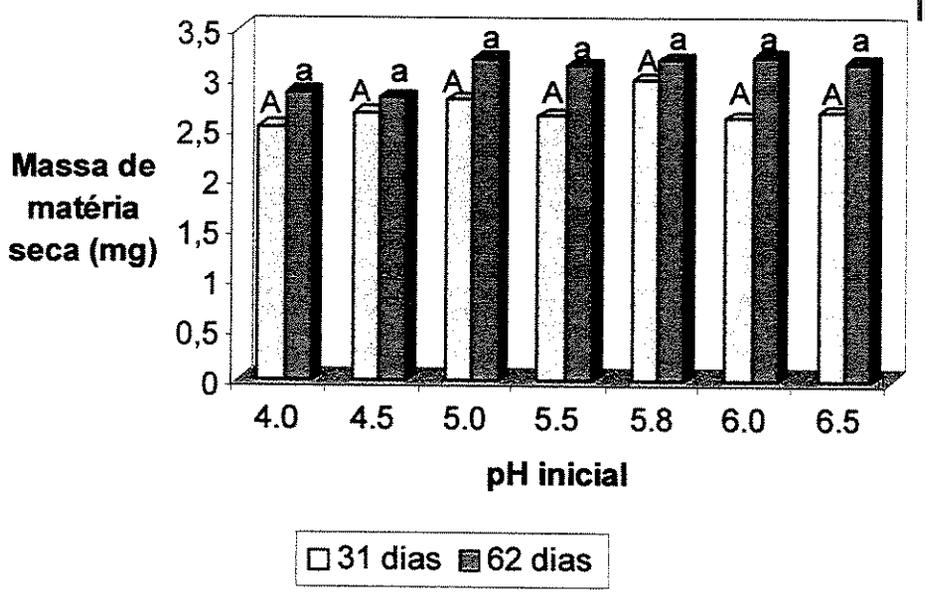
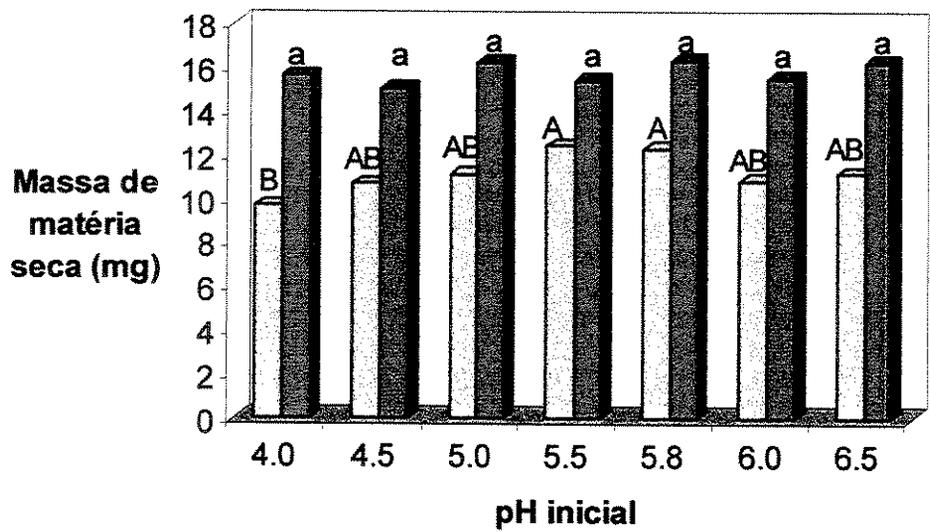
## 4. RESULTADOS

### 4.1. VARIAÇÃO DO pH INICIAL

Os valores de pH do meio nos diferentes tratamentos apresentaram variação, principalmente nos primeiros 31 dias de cultivo, com tendência à diminuição iniciada no 15º dia. Após 31 dias de cultivo, os meios de todos os tratamentos apresentavam valores de pH em torno de 3,5-3,6. A variação dos valores de pH ocorrida após este período de 31 dias iniciais foi significativamente diferente em todos os tratamentos (Tabela 3). Nos 31 dias finais de cultivo, praticamente não houve variação do pH, que permaneceram em valores próximos de 3,5. Com relação aos parâmetros de crescimento avaliados, foi possível verificar que o crescimento do eixo caulinar (fig.1) e massa seca de partes aéreas (fig. 2.I), foram afetados no tratamento com pH inicial 4,0, apresentando valores significativamente menores (Tuckey 5%), comparado com o crescimento ocorrido nos meios com valores iniciais de pH 5,5 e 5,8. Após 62 dias de cultivo, não houve diferenças significativas com relação a estes parâmetros. Não houve diferenças significativas na massa de matéria seca das raízes nos diversos tratamentos realizados (fig. 2.II).



**Figura 1.** Altura do eixo caulinar das plantas do clone de *B. tridentata* após 31 e 62 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS líquido, com diferentes valores iniciais de pH (Fotoperíodo de 16 horas/ 25-27°C). Letras minúsculas comparam alturas após 62 dias e letras maiúsculas após 31 dias. Letras distintas indicam diferenças significativas (Tuckey 5%,  $P < 0,05$ ).



**Figura 2.** Massa de matéria seca de partes aéreas (I) e de raízes (II) de plantas de *B. tridentata* após 31 e 62 dias de cultivo *in vitro* em meio MS líquido, com diferentes valores iniciais de pH (Fotoperíodo de 16 horas/ 25-27°C). Letras minúsculas comparam alturas após 62 dias e letras maiúsculas após 31 dias. Letras distintas indicam diferenças significativas (Tuckey 5%,  $P < 0,05$ ).

<b>pH inicial</b>	<b>pH após cultivo</b>	<b>Δ de pH</b>
4,0	3,56±0,03	0,44
4,5	3,57±0,08	0,93
5,0	3,60±0,08	1,40
5,5	3,58±0,05	1,92
5,8	3,61±0,12	2,19
6,0	3,61±0,04	2,38
6,5	3,58±0,12	2,92

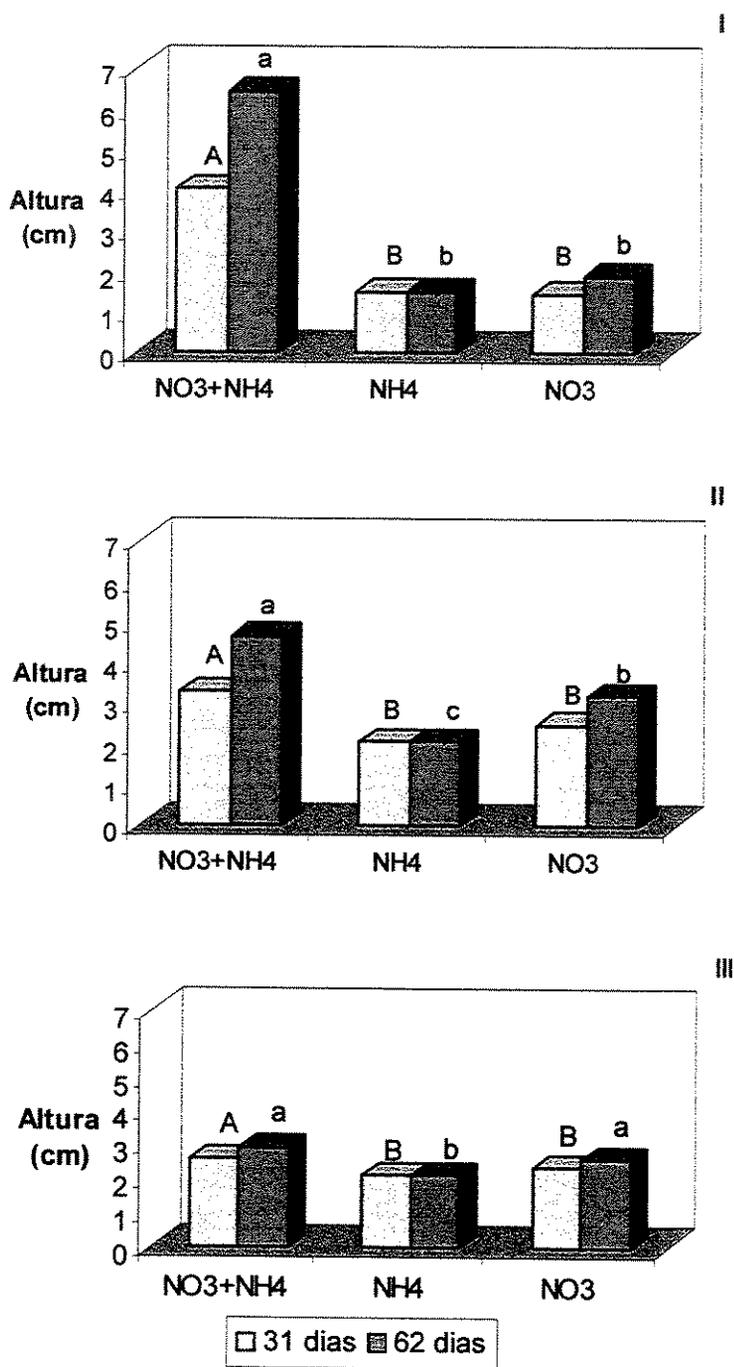
**Tabela 3.** Valores iniciais de pH do meio MS líquido e após 31 dias do cultivo *in vitro* de clone de *B. tridentata*. Os resultados constituem médias de 5 repetições. A variação de pH apresentou diferenças significativas (Tuckey 0,1%; P< 0,001).

## 4.2. EFEITO DA VARIAÇÃO DA FONTE E CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO

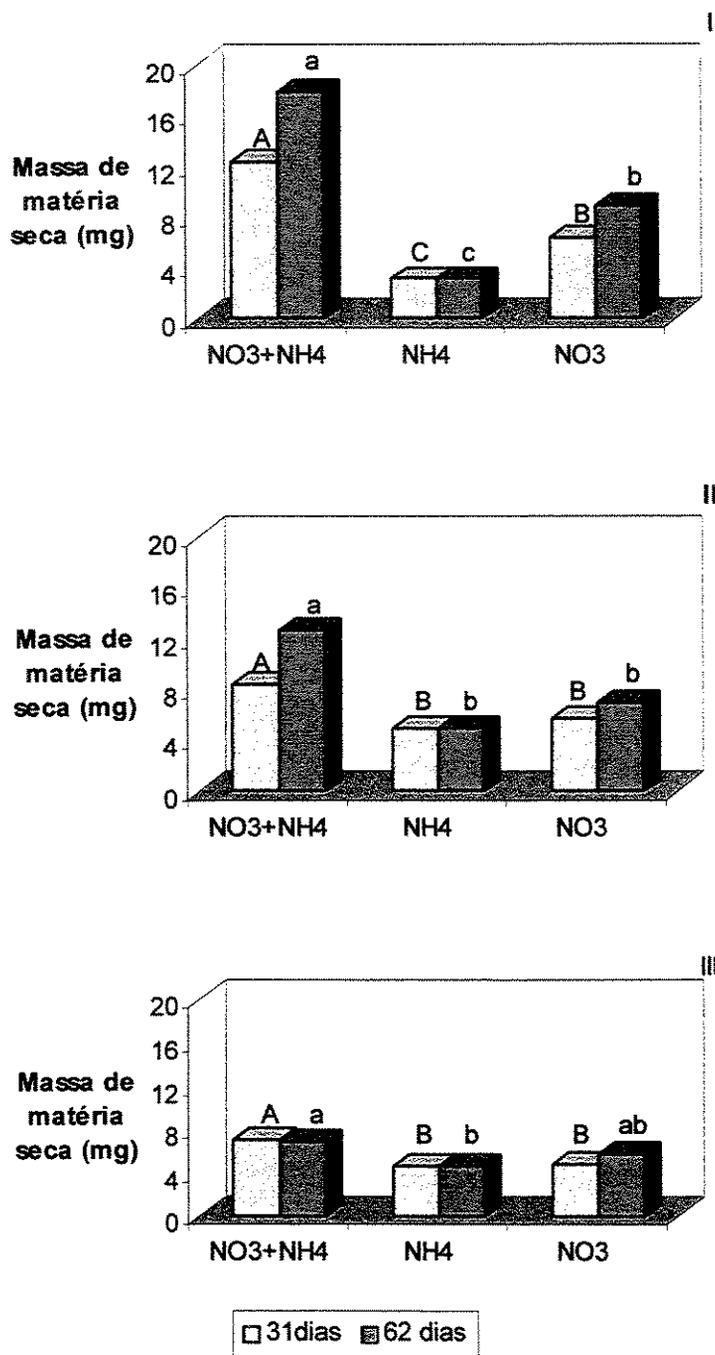
A fonte mista de nitrogênio ( $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ ) no meio de cultivo favoreceu o crescimento de plantas com altura e massa seca de partes aéreas significativamente maiores (altura após 31 dias: Tuckey 1%; após 62 dias: 0,1%; matéria seca após 31 dias: Tuckey 0,1%), quando comparada com as fontes de nitrogênio fornecidas isoladamente (fig.4 e 5). As diluições deste meio, independente de ser  $\frac{1}{2}$  ou  $\frac{1}{4}$ , resultaram em diminuição significativa da altura e da massa seca das plantas, após 31 dias, quando comparadas com a concentração original. Também nos 31 dias finais, houve diferença entre as três concentrações, sendo que a de  $\frac{1}{4}$  resultou em menor crescimento, em todos os parâmetros analisados (Tuckey 0,1%). Na concentração original do meio básico, a fonte mista de nitrogênio foi a única que favoreceu o desenvolvimento de plantas com raízes (fig.6).

Os meios que forneceram nitrato ou amônio isoladamente, resultaram em plantas significativamente menores. Apenas na diluição  $\frac{1}{4}$  e após 62 dias, as plantas cultivadas em meio com nitrato, apresentaram crescimento em altura similar à obtida em meio com fonte mista (fig.4). No meio com amônio, após 31 dias de cultivo, as plantas apresentavam sinais de deficiência nutricional, com folhas secas, e no decorrer do período seguinte de cultivo, elas secaram completamente. Já as plantas cultivadas em meio com nitrato estavam saudáveis após 62 dias de cultivo. O efeito da diluição do meio com nitrato como única fonte, analisado estatisticamente, evidenciou que nos 31 dias iniciais de cultivo, as diluições à  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{1}{4}$  resultaram em valores maiores de altura e matéria seca de raízes (Tuckey 0,1%), enquanto a das partes aéreas, foi significativamente diferente apenas entre a diluição à  $\frac{1}{4}$  e a concentração original (Tuckey 1%). Após os 31 dias finais de cultivo, altura e matéria seca de partes aéreas, apresentaram o mesmo perfil do período inicial. Já a matéria seca das raízes, foi significativamente maior nas diluições à  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{1}{4}$ . Com relação ao meio com amônio, a diluição

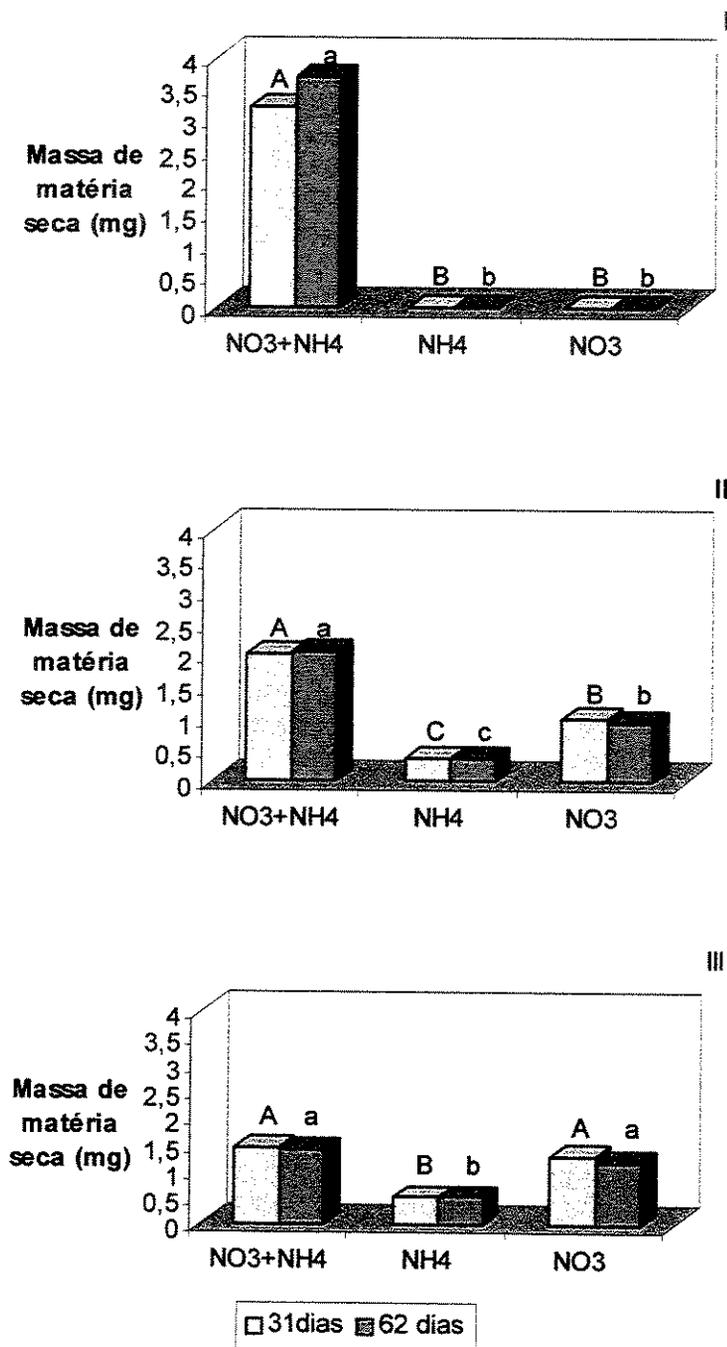
favoreceu significativamente os três parâmetros avaliados, após 31 dias de cultivo (Tuckey 0,1%). Comparando-se as três fontes de nitrogênio, verificamos que apenas na diluição a ¼, o meio com nitrato apresentou a mesma eficiência que o meio com fonte mista, com relação ao parâmetro massa seca das raízes. Estes valores foram sempre mais baixos no meio com amônio, independente da diluição, quando comparados com as outras fontes de nitrogênio (fig.6). Após 31 dias de cultivo, os valores do pH do meio com fonte mista permaneceram praticamente constantes (pH 3,6), enquanto nos meios nitrato e amônio, os valores de pH aumentaram e diminuíram, respectivamente, à medida em que ocorreram as diluições (fig.7). Em cada concentração os valores de pH diferiram significativamente, nos três meios testados (Tuckey 0,1%).



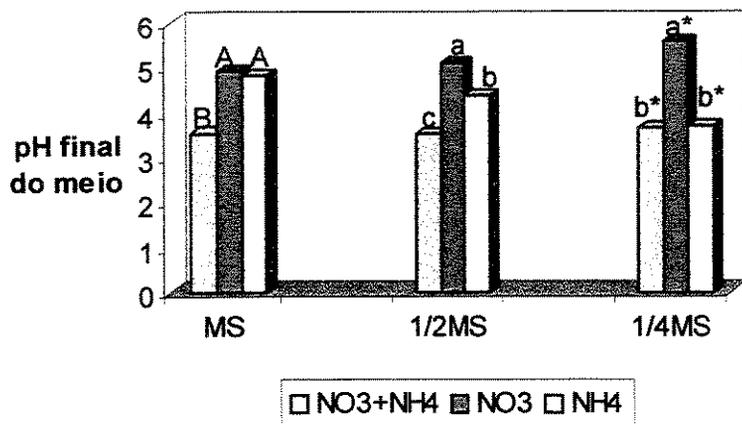
**Figura 4.** Altura do eixo caulinar de plantas de *B. tridentata* aos 31 e 62 dias de cultivo *in vitro* em meio MS líquido com diferentes fontes de nitrogênio (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), na concentração original: I (MS), diluído à metade: II (1/2MS) e diluído à ¼: III (1/4MS). Letras distintas indicam diferenças significativas no teste de Tuckey: I e II (0,1%), III (1% nos dados obtidos aos 31 dias, 0,1% nos obtidos aos 62 dias). Letras maiúsculas comparam altura após 31 dias de cultivo e letras minúsculas comparam altura aos 62 dias.



**Figura 5.** Massa de matéria seca de partes aéreas de clone de *B. tridentata* após 31 e 62 dias de cultivo *in vitro* em meio MS líquido, (I) na concentração original (MS), (II) diluído pela metade (1/2MS) e (III) à um quarto (1/4MS); com diferentes fontes de nitrogênio (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Letras maiúsculas comparam resultados após 31 dias e letras minúsculas comparam resultados após 62 dias. Letras distintas indicam diferenças significativas (Tuckey 0,1%; P < 0,001).



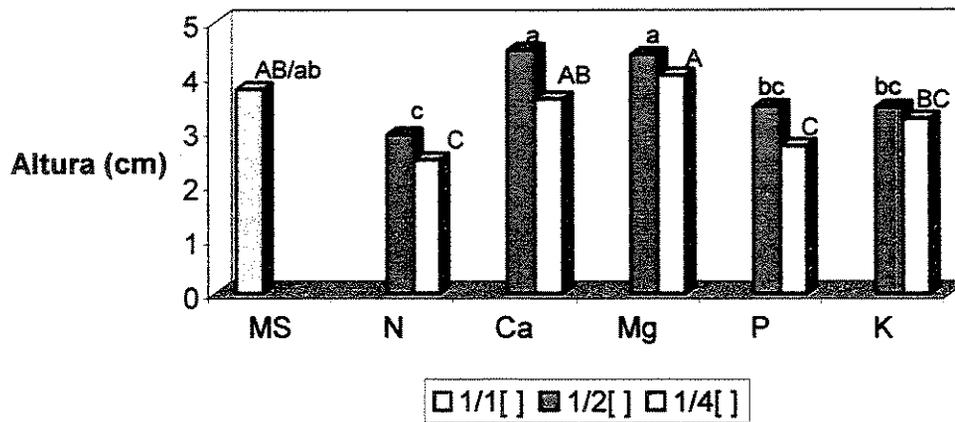
**Figura 6.** Massa de matéria seca de raízes de clone de *B.tridentata* após 31 e 62 dias de cultivo *in vitro* em meio MS líquido, (I) na concentração original (MS), (II) diluído pela metade(1/2MS) e (III) à um quarto (1/4MS); com diferentes fontes de N (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Letras maiúsculas comparam resultados após 31 dias e letras minúsculas comparam resultados após 62 dias. Letras distintas indicam diferenças significativas (Tuckey 0,1% ; P< 0,001).



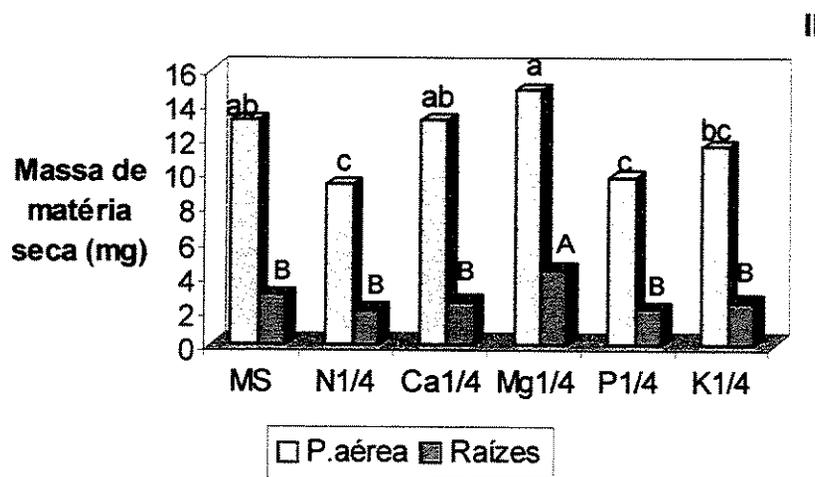
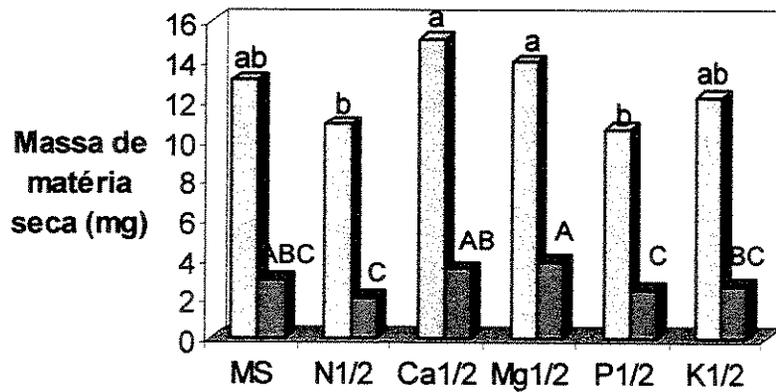
**Figura 7.** Valores de pH final do meio MS líquido (concentração original, diluído à ½ e ¼) com diferentes fontes de nitrogênio (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) após 31 dias de cultivo *in vitro* de clone de *B. tridentata*. Letras distintas indicam diferenças significativas (Tuckey 0,1%, P<0,001). Letras maiúsculas comparam valores na concentração original, letras minúsculas na diluição ½ e letras minúsculas com \* comparam valores na diluição ¼.

### 4.3. EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MACRONUTRIENTES.

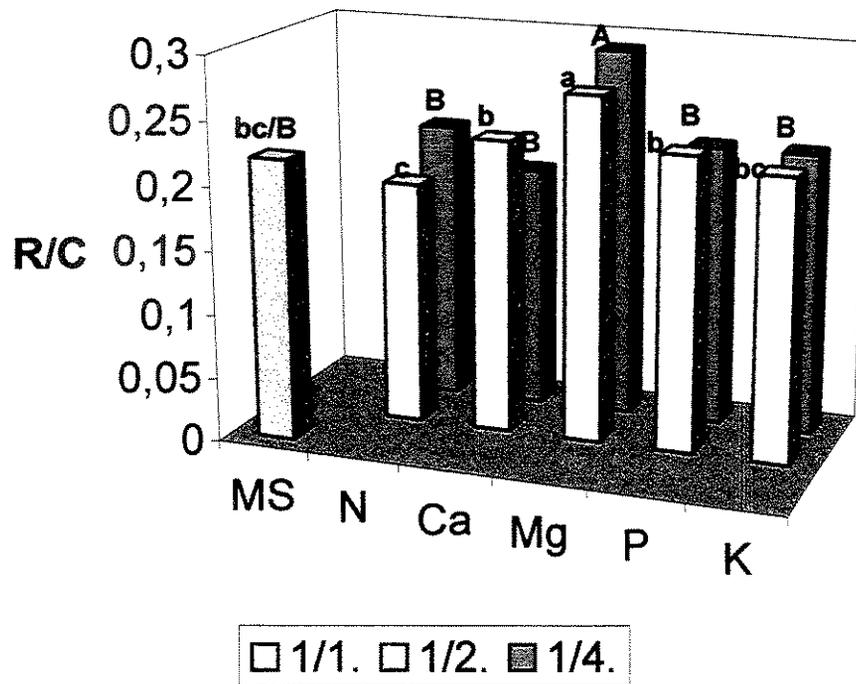
A diluição da concentração de nitrogênio para  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{1}{4}$  afetou o crescimento de plantas de *B.tridentata*, tanto em relação ao incremento da altura quanto a massa seca das partes aéreas. Nestes parâmetros, os valores foram significativamente menores (Tuckey 0,1%) do que os obtidos na concentração original do meio MS (fig. 8 e 9). Com relação à massa seca das raízes, não houve diferença significativa entre os meios com a concentração reduzida e a original. A queda da concentração de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  também afetou o crescimento em altura e massa seca de partes aéreas, diminuindo significativamente (Tuckey 0,1%) apenas na diluição à  $\frac{1}{4}$ . Quanto ao magnésio, verificamos, que a redução da concentração de  $\text{MgSO}_4$  aumentou os valores de massa seca das raízes (Tuckey 0,1%) quando comparada com a concentração original do meio MS (fig.9). De maneira análoga, a razão entre a massa seca das raízes e partes aéreas (R/C) foi maior (Tuckey 0,1%), nas menores concentrações de  $\text{MgSO}_4$  (fig.10). A redução da concentração de  $\text{CaCl}_2$  para  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{2}$  produziu crescimento em altura equivalente ao obtido com a concentração original do meio MS (fig. 8). A diluição do potássio praticamente não afetou os parâmetros de crescimento avaliados.



**Figura 8.** Altura do eixo caulinar de clones de *B. tridentata* após 31 dias de cultivo *in vitro* em meio MS líquido com a concentração original dos macronutrientes (MS) e com a concentração de N, Ca, Mg, P e K diluídas a  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{1}{4}$ . Letras minúsculas comparam alturas da diluição para  $\frac{1}{2}$  de cada elemento com a concentração original do meio MS, e letras maiúsculas comparam os resultados obtidos na diluição  $\frac{1}{4}$ . Letras distintas indicam diferenças significativas (Tuckey 0,1%;  $P < 0,001$ ).



**Figura 9.** Massa de matéria seca de partes aéreas e raízes, após 31 dias de cultivo *in vitro* de clone de *B. tridentata* em meio MS líquido na concentração original e em meios MS com concentração de macronutrientes reduzidos à metade (I) e à  $\frac{1}{4}$  (II). Letras minúsculas comparam massa de matéria seca de partes aéreas e letras maiúsculas de raízes, com a concentração original do meio MS. Letras distintas indicam diferenças significativas (Tuckey 0,1%;  $P < 0,001$ ).



**Figura 10.** Razão entre a massa de matéria seca de raízes e caule (R/C) de clone de *B. tridentata*, após 31 dias de cultivo *in vitro* em meio MS básico líquido, com a concentração original do meio MS e com a concentração de cada macronutriente (N, Ca, Mg, P e K) diluída à  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{1}{4}$ . Letras distintas indicam diferenças significativas (Tuckey 0,1%,  $P < 0,001$ ). Letras minúsculas comparam valores obtidos na diluição  $\frac{1}{2}$ , e letras maiúsculas valores da diluição  $\frac{1}{4}$ , em relação à concentração original do meio MS.

## 5. DISCUSSÃO

A diminuição do pH do meio de cultivo após 31 dias pode estar relacionada à absorção diferencial de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  pelas plantas ou a liberação de substâncias para o meio (Caldas *et al.*, 1998; Endress, 1994). Embora várias espécies de plantas possam crescer em solos com valores de pH que vão de 4,0 a 8,0, sabe-se que a concentração de íons  $\text{H}^+$  e  $\text{OH}^-$  exercem grande influência no crescimento das plantas, seja através do efeito direto dos íons, ou por alterar a solubilidade dos nutrientes minerais (Islam *et al.*, 1980). Alterações na concentração dos íons  $\text{H}^+$  geralmente afetam reações enzimáticas específicas. Em cultura de células de *Cinchona* a redução do pH diminuem a vitalidade das células (Endress, 1994). Em geral, os valores de pH 5,5 e 5,8, que em nosso experimento favoreceram o crescimento da espécie em estudo, são os mais convenientes, certamente por favorecer a solubilidade da maioria dos nutrientes minerais, sendo estes os valores de pH mais comumente utilizados em cultura de tecidos (Caldas *et al.*, 1998). Um fato interessante foi a manutenção dos valores de pH ácido (em torno de pH 3,6), nos 31 dias finais de cultivo, em todos os tratamentos, e a observação do crescimento das plantas, neste pH, sem sinais externos de deficiência nutricional ou toxicidade, sugerindo que a espécie em estudo, provavelmente, apresenta estratégias de adaptação a solos ácidos.

A maioria das plantas, inclusive as cultivadas *in vitro*, têm capacidade de absorver e assimilar tanto íons nitrato como amônio (Kirby *et al.*, 1987), havendo, no entanto, grande variação nas respostas fisiológicas entre as plantas. A grandeza destas diferenças dependem da espécie da planta, da concentração e da fonte de nitrogênio, do pH do meio, e do estágio de desenvolvimento, entre outros fatores (Takacs & Tecsí, 1992). A superioridade da fonte de mista de nitrogênio, observada no crescimento de *B. tridentata*, tem sido relatada por vários autores, em trabalhos com outras espécies. O crescimento de algumas culturas de tecidos

vegetais é inibido severamente quando se utiliza apenas nitrato, sendo necessário a adição de baixas concentração de amônio. Este efeito sinérgico parece ser devido à utilização inicial de amônio, após a qual, nitrato é utilizado (Kirby *et al.*, 1987). A razão entre os dois íons é determinante, sendo que, para a maioria das culturas, a concentração de amônio não deve ser maior do que 1/3 da concentração do nitrato (Caldas *et al.*, 1998).

O baixo crescimento e debilidade das plantas, observados em nosso experimento, após nutrição com  $\text{NH}_4^+$  como única fonte, podem ser atribuídos aos efeitos resultantes da acidificação da região da raiz, assim como à toxicidade deste íon como desacoplador da fotofosforilação (Tolley-Henry & Raper, 1986; Salsac *et al.*, 1987). A acidificação diminuiria a absorção de alguns íons, inclusive de amônio, provocando sintomas de deficiência nutricional, como folhas amarelas e secas (Tolley-Henry & Raper, 1986).

Alguns autores têm relatado que o crescimento de plantas supridas com  $\text{NO}_3^-$  como única fonte, foi igual ou superior à nutrição com fonte mista ( $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ ). No entanto para a planta em estudo, esta única fonte de nitrogênio não favoreceu o crescimento. O metabolismo do nitrato envolve a sua redução até amônio, antes da assimilação em aminoácidos, sendo que esta pode ocorrer nas raízes ou nas partes aéreas, dependendo das condições de cultivo, da idade e da espécie da planta (Taiz & Zeiger, 1991). No experimento em que se usou nitrato como única fonte de nitrogênio, o aumento significativo da massa seca das raízes, observado após diluição do meio, poderia ser devido ao efeito da concentração deste íon. Segundo Sutherland *et al.*, (1985), a assimilação do nitrato é predominante nas raízes em condições de baixa concentração externa deste íon, enquanto que em altas concentrações, a assimilação nas partes aéreas é maior.

Os macronutrientes diferem em seus efeitos sobre o crescimento dependendo da disponibilidade e requerimentos específicos de cada espécie. A concentração de fósforo no meio MS básico é considerada baixa para muitas espécies, sendo necessário complementações

(Caldas *et al.*, 1998). O fato da diminuição da concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ter afetado pouco o crescimento *in vitro* em altura desta espécie, sugere um requerimento menor, específico desta espécie. Requerimento menor também foi observado em relação ao cálcio e magnésio, evidenciando a necessidade de otimizar as concentrações dos elementos minerais, assim como outros nutrientes, no meio de cultivo para cada espécie, evitando concentrações desnecessárias. O aumento do crescimento em altura observado quando se diminuiu a concentração de  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ , poderia ser resultante do efeito da concentração destes elementos na absorção dos demais nutrientes minerais. Várias interações iônicas podem ocorrer, envolvendo competição por um mesmo sítio de absorção, sendo fundamental o estabelecimento de um balanço de cargas adequado (Taiz & Zeiger, 1991). A maior massa seca das raízes, observada no tratamento com menor concentração de Mg, é um resultado que poderia ser vantajoso no transplântio de plantas micropropagadas, possibilitando maior sobrevivência das plantas durante a aclimação.

Estes resultados também são interessantes para cultivo de plantas que acumulam compostos secundários úteis nas raízes, quando o aumento da biomassa deste órgão vegetal é desejado (Pedro M. Magalhães, comunicação pessoal).

## 6. CONCLUSÕES

Plantas micropropagadas de *B. tridentata* cultivadas *in vitro* acidificam o meio de cultivo após 31 dias e mantém este pH ácido (pH 3,6), durante um período posterior de 31 dias de cultivo. A manutenção do pH ácido pode ter sido resultado da baixa capacidade tamponante do meio e o crescimento sem sintomas de deficiência ou toxicidade sugere estratégias de adaptação a esta condição. Estas plantas apresentaram preferência por meios de cultivo mais ricos em nutrientes minerais, como o meio MS na sua concentração original. No entanto, a diminuição de alguns macronutrientes específicos, como cálcio e magnésio, sem diminuir a concentração de nitrogênio, resultaram em igual ou maior crescimento, evidenciando a importância de otimizar as concentrações dos nutrientes do meio de cultivo, pois cada espécie apresenta requerimentos específicos. Além disso, o aumento da massa seca das raízes com a diminuição de magnésio no meio, poderia ser aplicado para melhorar a taxa de sobrevivência das plantas durante o transplante para condição *ex-vitro*, quando raízes bem desenvolvidas são importantes. Conclui-se que o meio ótimo para micropropagação de *B. tridentata* seria o meio MS, pH 5,8, com concentrações de magnésio e cálcio do meio MS original, reduzidas à  $\frac{1}{4}$ .



### **CAPÍTULO III**

**ANÁLISE COMPARATIVA DA ANATOMIA DAS ESTRUTURAS FOLIARES DE  
*Baccharis tridentata* CULTIVADA EM CASA DE VEGETAÇÃO, EM DIFERENTES  
CONDIÇÕES *IN VITRO* E APÓS ACLIMATAÇÃO.**



## RESUMO

Plantas cultivadas *in vitro* apresentam características anatômicas específicas, com mesofilo pouco diferenciado, apresentando grandes espaços intercelulares. Os tricomas podem estar diminuídos e os estômatos em geral são pouco funcionantes, embora em grande quantidade. Estas características podem estar relacionadas com as dificuldades de sobrevivência das plantas na fase de aclimação e também com a baixa produção de compostos secundários nas plantas *in vitro*. Tendo em vista a estreita correlação entre a diferenciação morfológica e a diferenciação bioquímica dos tecidos vegetais, e a interação destas com o metabolismo primário e secundário das plantas, estudos anatômicos e histoquímicos podem fornecer valiosas informações sobre a potencial capacidade das plantas produzirem compostos secundários, assim como superar os desafios da aclimação.

A comparação da anatomia de *B. tridentata* em três diferentes cultivos, casa de vegetação, *in vitro* e após aclimação, revelaram que plantas aclimatadas apresentam características muito semelhantes à do cultivo tradicional, enquanto que o clone micropropagado, apesar da pouca diferenciação do mesofilo, contém tricomas glandulares (TG) morfológicamente semelhantes aos da planta matriz. A variação das condições do microambiente do cultivo *in vitro*, sugeriram haver uma certa plasticidade das estruturas do mesofilo. A utilização do tampão de algodão no lugar do convencional PVC, resultou em maior diferenciação do parênquima paliçádico, nas plantas cultivadas *in vitro*, provavelmente devido a alteração das trocas gasosas. Os estudos anatômicos e histoquímicos dos TG *in vitro*, nesta condição de vedação, mostraram uma diferenciação destas estruturas, sendo observadas cutículas distendidas, sugerindo a produção de secreção. Estas observações abrem perspectivas no sentido do monitoramento das condições ambientais do cultivo *in vitro*, visando maior

possibilidade de sobrevivência dos clones aclimatados assim como a produção de compostos secundários pelas culturas de partes aéreas (“shoot culture”).

## 1. INTRODUÇÃO:

A produção de compostos secundários úteis através do cultivo de células e/ou tecidos é vantajosa, pois oferece a possibilidade de um maior controle das condições ambientais, permitindo a otimização da produção *in vitro* e favorecendo a biossíntese de compostos que naturalmente não ocorrem na planta (Balandrin *et al.*, 1985; Alfermann & Petersen, 1995). A biossíntese de compostos secundários pode estar condicionada ou não à diferenciação celular. A ocorrência de compostos químicos de interesse comercial em cultura de calos e suspensão de células tem sido bem divulgada. No entanto, para alguns compostos, esta produção requer estruturas vegetais diferenciadas (Whitaker & Hashimoto, 1986; Robins, 1994). Parece haver estreita correlação entre diferenciação morfológica das células e diferenciação bioquímica, que permite o estabelecimento de rotas metabólicas levando à biossíntese de compostos secundários (Croes *et al.*, 1989). Isto é particularmente constatado na produção de terpenos, em glândulas especializadas no interior ou nas superfícies dos órgãos. Culturas ausentes destas estruturas parecem não ser competentes na acumulação destes produtos (Robins, 1994).

Muitos compostos secundários economicamente importantes são produzidos nos tricomas glandulares, que são estruturas altamente diferenciadas da epiderme (Wagner, 1991). A produção destes compostos através do cultivo de partes aéreas (“shoot cultures”) tem sido relatada, sendo no entanto, inferior à obtida no cultivo convencional (Woerdenbag *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 1995). Esta baixa produção pode estar relacionada com as características fisiológicas e/ou anatômicas das plantas obtidas.

As plantas *in vitro* apresentam, em geral, folhas com mesofilo incompletamente diferenciado, com o parênquima paliádico ausente ou pouco definido, espaços intercelulares muito grandes e numerosos, e cloroplastos com poucos grânulos de amido (Wetzstein & Sommer, 1982; Johansson *et al.*, 1992). Além disso, o número de tricomas pode estar

diminuído nestas plantas (Donnelly & Vidaver, 1984, citado por Majada *et al.*, 2000). A vedação dos frascos de cultivo controla as trocas gasosas entre o interior e o ambiente externo (Kavanagh *et al.*, 1991; Kozai, 1995). Segundo Zobel, (1987, citado por Kavanagh *et al.*, 1991), sob condições de reduzida aeração, compostos voláteis podem se acumular e modificar a diferenciação e o crescimento destas culturas.

Outra característica do cultivo *in vitro* é o fornecimento da fonte de energia no meio de cultura, que permite que as plantas cresçam com pouca ou nenhuma atividade fotossintética (Caldas *et al.*, 1998; Kozai, 1995). Alguns autores têm verificado que a sacarose no meio de cultivo inibe a biossíntese de clorofila (Edelman & Hanson, 1972), e portanto a própria atividade fotossintética das plantas (Capellades *et al.*, 1991; Woerdenbag *et al.*, 1993). Considerando a importância da atividade fotossintética no metabolismo primário e secundário, seria recomendável a sua realização *in vitro*, tanto para a biossíntese de compostos (Fowler, 1985), como também para diminuir a diferença entre esta condição e aquela que a planta enfrenta no ambiente natural.

Além destes fatores, são bem conhecidos os efeitos dos fitorreguladores e da luz na diferenciação celular. Chien & Sussex, (1996) verificaram o efeito das giberelinas na diferenciação dos tricomas em folhas de *Arabidopsis thaliana* e alguns autores (Aloni, 1987; Biasi & Altamura, 1996) relataram que a luz pode aumentar a diferenciação dos tecidos vasculares. Também já está bem comprovado o efeito da luz na biossíntese dos flavonóides (Kubasek *et al.*, 1998).

As características anatômicas próprias das plantas cultivadas *in vitro* também estão relacionadas com o desempenho durante a fase de aclimação (Kozai, 1991; Majada *et al.*, 2000). Nesta fase, as plantas precisam rapidamente se adaptar a uma condição de baixa umidade relativa e são forçadas a desenvolver autotrofia (Kozai, 1991). As baixas taxas de

sobrevivência durante esta fase têm comprometido seriamente muitos projetos de micropropagação (Kozai, 1991; Johanson *et al.*, 1992).

Sabe-se que, embora as características fisiológicas, anatômicas e bioquímicas das plantas sejam largamente genótípicas, as condições ambientais exercem forte influência na expressão dos genes envolvidos. A compreensão dos mecanismos e dos fatores que influenciam a diferenciação das plantas cultivadas *in vitro*, pode contribuir para o aperfeiçoamento das estratégias visando a produção de plantas mais “competentes” durante a aclimação, assim como para a produção de compostos de interesse. Também é importante ressaltar que apesar do grande número de estudos, principalmente ultraestruturais e histoquímicos, em tricomas glandulares de muitas espécies, os estudos *in vitro* são raros.

*Baccharis tridentata* é uma planta aromática de uso medicinal como febrífuga e diurética em algumas regiões do Brasil (Uphof, 1968). Recentemente foi comprovada ação do nerolidol, um dos constituintes do óleo essencial desta, e de outras espécies, contra o parasita da malária sugerindo aplicação terapêutica deste composto (Lopes *et al.*, 1999; Macedo *et al.* 2002). Esta espécie apresenta tricomas glandulares e não glandulares nas superfícies de suas partes aéreas. Outras estruturas secretoras também já foram nela caracterizadas, como os ductos secretores presentes no floema dos feixes vasculares das folhas (Castro *et al.*, 1997). *B. tridentata* respondeu favoravelmente ao cultivo *in vitro*, através do qual foi estabelecido um banco de plantas homogêneas (Kajiki & Shepherd, resultados apresentados no capítulo I), que serão utilizadas neste presente trabalho.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Comparar anatômica e histoquímicamente as estruturas foliares de *B. tridentata* cultivada em casa de vegetação, *in vitro* e aclimatada;

2. Caracterizar os tricomas glandulares de folhas jovens de um clone de *B. tridentata* cultivado *in vitro*;

3. Investigar os efeitos:

3.1. da interação entre concentração de sacarose e fotoperíodo,

3.2. alteração da vedação,

3.3. da adição de GA<sub>3</sub>,

na diferenciação de estruturas da folha e ápices caulinares, assim como possíveis alterações histoquímicas nos tricomas glandulares, em clone de *B. tridentata* cultivado *in vitro*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL BOTÂNICO:

Foram utilizadas folhas e ápices caulinares de *B. tridentata* nas seguintes condições (fig.1):

3.1.1 Plantas de *B. tridentata* cultivadas em vasos (terra vegetal) a partir de mudas trazidas do Parque Nacional de Itatiaia. As amostras foram coletadas de plantas com 18 meses de cultivo em casa de vegetação.

3.1.2 Material *in vitro*: Clone de *B. tridentata* cultivado e micropropagado via inoculação de ápices caulinares em meio MS básico, pH 5,8 e 3% de sacarose, solidificado com 2,5 g/L de phytigel. O cultivo foi realizado em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, e temperatura de 25-27° C. Plantas cultivadas nas condições citadas foram utilizadas como fontes de explantes para os tratamentos realizados.

3.1.3 Clone aclimatado: Plantas de *B. tridentata* cultivadas *in vitro* em meio MS básico, foram aclimatadas em condição *ex vitro* e mantidas em casa de vegetação. As amostras foram coletadas após 6 meses da aclimação.

#### 3.2 TRATAMENTOS APLICADOS AO CLONE CULTIVADO *IN VITRO*

Explantes constituídos de ápices caulinares ( $\pm$  1,2cm de altura e 3 folhas jovens) obtidos de plantas de 31 dias de idade, foram submetidos a diferentes tratamentos. Foi inoculado um ápice caulinar por frasco de cultivo. Foram realizadas cinco repetições/tratamento.

### **3.2.1. EFEITO DO FOTOPERÍODO E SACAROSE:**

Os explantes foram inoculados em meio MS básico com 3%, 2% e 1% de sacarose e cultivados durante 31 dias à temperatura de 25-27°C e em fotoperíodo de 16 horas. Parte do material foi submetido à luz contínua (LC) após 15 dias do início do experimento. Deste modo foram realizados 6 tratamentos:

T1 (Controle): Meio MS com 3% Sacarose, Fotoperíodo 16 horas.

T2: Meio MS com 3% sacarose, Fotoperíodo 16 horas/LC.

T3: Meio MS com 2% de sacarose, Fotoperíodo 16h.

T4: Meio MS com 2% de sacarose, Fotoperíodo 16h./LC

T5: Meio MS com 1% de sacarose, Fotoperíodo 16h.

T6: Meio MS com 1% de sacarose, Fotoperíodo 16h./LC.

### **3.2.2. EFEITO DA VEDAÇÃO DO FRASCO DE CULTIVO**

Controle: Vedação com película de polivinilcloro (PVC), utilizada em todos os demais tratamentos.

Tratamento: Vedação com tampão de algodão e gaze. Os explantes submetidos a este tratamento permaneceram os dez dias iniciais do cultivo com vedação de PVC, sendo nos 21 dias finais, vedados com o tampão de algodão. Foram cultivados em temperatura de 25-27°C, fotoperíodo de 16 horas e fotoperíodo 16h/LC, conforme descrito no item 3.2.1.

### **3.2.3. EFEITO DA ADIÇÃO DE GA<sub>3</sub>**

Controle: Meio MS básico sem adição de GA<sub>3</sub>

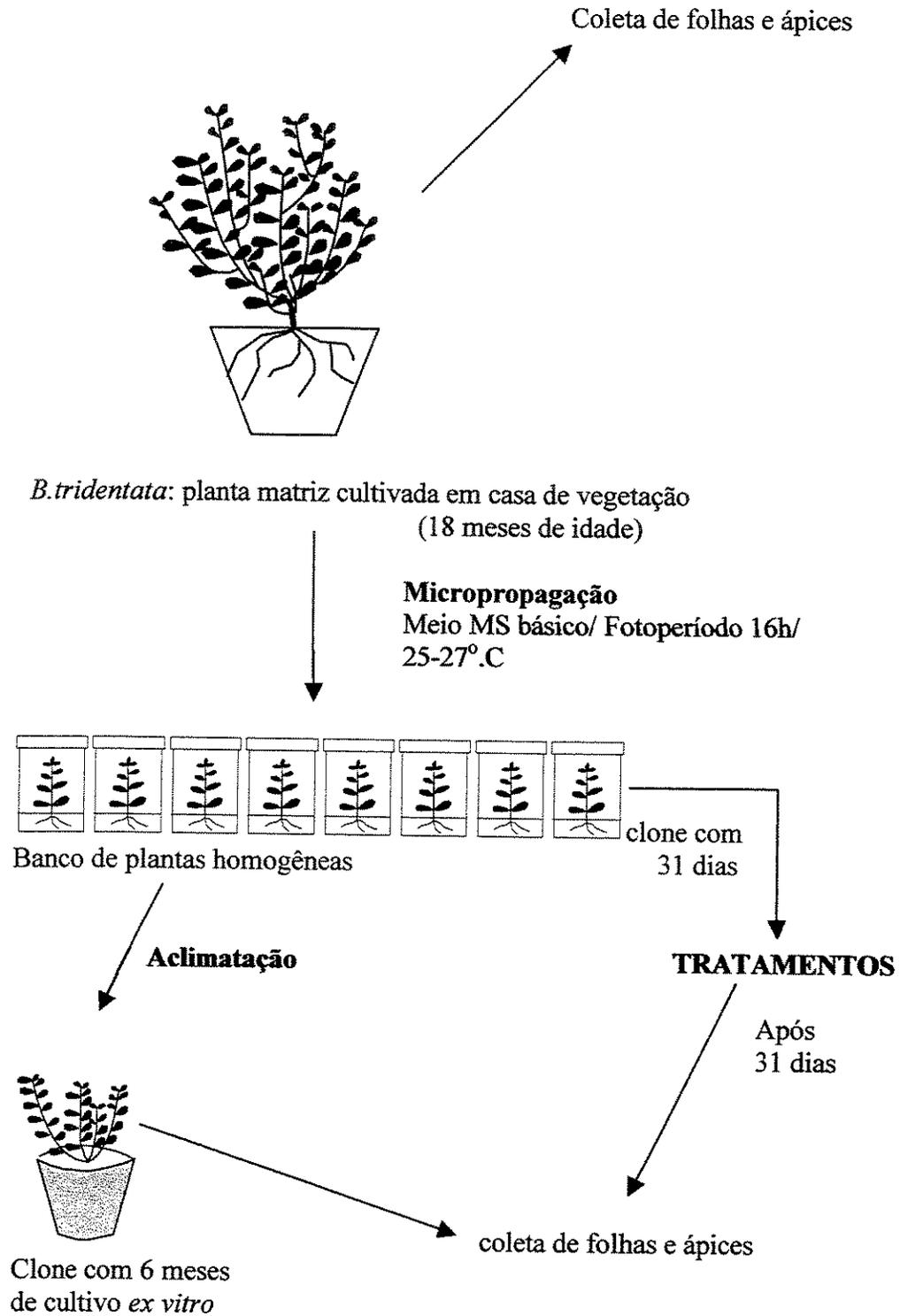
Tratamento 1: Meio MS básico com 1mg/L de GA<sub>3</sub>

Tratamento 2: Meio MS básico com 5mg/L de GA3

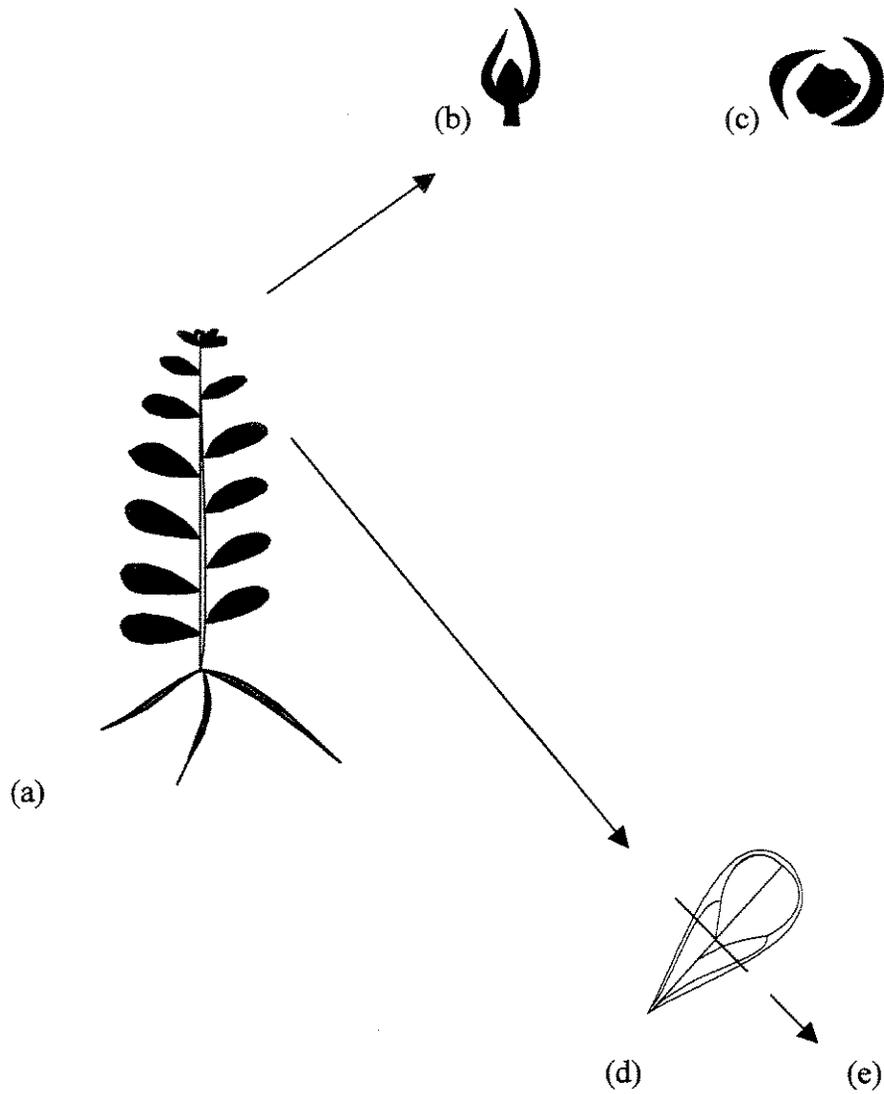
Os explantes foram cultivados sob fotoperíodo 16h/ LC; e temperatura de 25-27°C.

### **3.3. COLETA DAS AMOSTRAS**

As amostras consistiram de folhas adultas, totalmente expandidas, do 6º nó 7 (contado a partir do ápice), e de ápices caulinares (cerca de 0,5 cm de altura) (fig. 2). Foram coletadas amostras de 3 plantas (repetições) de cada tratamento, separados aleatoriamente após 31 dias de cultivo, e processados para análise microscópica. Do mesmo modo, foram coletadas amostras (conforme descrição acima), da planta cultivada em casa de vegetação (planta matriz) e do clone aclimatado.



**Figura 1.** Esquema mostrando a origem e obtenção do material botânico utilizado neste experimento.



**Figura 2.** Esquema de coleta das amostras. **a:** *B. tridentata* em casa de vegetação, *in vitro* e aclimatada, **b:** ápice caulinar; **c:** corte transversal do ápice caulinar; **d:** folha adulta do 6°. Ou 7°. nó; **e , e:** área examinada (corte transversal).

### 3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA:

#### 3.4.1 MICROSCOPIA DE LUZ

Ápices caulinares medindo cerca de 0,5 cm de altura e área foliar da região mediana da folha, foram fixados em solução contendo 4% de paraformaldeído, 2% de glutaraldeído, 3% de sacarose e 5mM de cloreto de cálcio, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 6,8 (Karnovsky, 1965 modificado). O tempo de fixação foi de 4 horas, após o qual as amostras foram lavadas em solução de 3% de sacarose, 5mM de cloreto de cálcio no mesmo tampão do fixador por cerca de 90 minutos. A seguir, as amostras foram tratadas com a mesma solução da lavagem acrescida de 0,15M de glicina e mantidas em temperatura de 4° C durante 12 horas, lavadas novamente em tampão cacodilato 0,1M, pH 6,8 (3 vezes de 30 minutos cada), sendo então rapidamente lavadas em água destilada.

As amostras foram desidratadas em série etanólica iniciando em 70% até 100%, permanecendo 30 minutos em cada etapa da série. Iniciou-se então a infiltração da resina JB4, utilizando-se da mistura etanol absoluto/resina nas proporções: 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, permanecendo 2 horas em cada etapa e, finalmente, por 12 horas em resina pura. As amostras foram emblocadas e colocadas para secar, 2 horas em temperatura ambiente e 12 horas em estufa à 60° C. Três amostras de folhas e três dos ápices, de cada tratamento, foram incluídas em cada bloco. Os blocos foram preparados para microtomia e obtidos cortes transversais com 5µm de espessura. Cerca de 8 cortes foram distendidos sobre lâmina, aderidos por aquecimento, e submetidos a diferentes métodos de coloração.

As lâminas foram observadas em microscópio de luz comum e luz polarizada, marca Olympus, modelo BX60 do laboratório do Departamento de Biologia Celular/ IB/UNICAMP. Os registros fotográficos foram feitos em negativo Kodak Gold 100.

#### **3.4.1.1 COLORAÇÃO PELO AZUL DE TOLUIDINA (AT) pH 4,0**

Para a detecção de radicais aniônicos e metacromasia, os cortes foram submetidos à coloração pelo Azul de Toluidina 0,025%, em tampão McIlvaine, pH 4,0 durante 15 minutos à temperatura ambiente, seguida da lavagem rápida em água destilada. Os cortes foram secos ao ar, diafanizados em xilol durante dez minutos e montados em Entellan (Vidal, 1977).

#### **3.4.1.2. XYLIDINE PONCEAU (XP) pH 2,5**

Para a detecção de radicais catiônicos, os cortes foram submetidos à coloração com solução de Xylidine Ponceau 0,1%, pH 2,5 em solução de ácido acético 3%(v/v) durante 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram lavadas em ácido acético 3%(v/v) durante 30 minutos, e posteriormente em água destilada, rapidamente. Os cortes foram desidratados em etanol 95% e 100% por cinco minutos cada, diafanizados em xilol durante dez minutos e montados com Entellan (Vidal, 1970).

#### **3.4.1.3. MÉTODO DO PAS**

Com o objetivo de identificar polissacarídeos neutros e glicoproteínas, os cortes foram inicialmente oxidados em solução aquosa de ácido periódico 0,5% durante 9 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram lavadas 2 vezes em água destilada, secas ao ar e tratadas com Reativo de Schiff (Mello & Vidal, 1978) durante 30 minutos, no escuro e temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com água destilada e secas ao ar. Os cortes

foram desidratados em etanol 95% e 100% durante 5 minutos cada, diafanizados em xilol por dez minutos e montados em Entellan (Maia, 1979).

#### **3.4.1.4. Sudan Black B**

Para a detecção de lipídios o material foi submetido à coloração com solução saturada de Sudan Black B, em 70% de etanol durante 30 minutos, lavado duas vezes, rapidamente, em etanol 70% e montado em glicerina (Maia, 1979).

### **3.4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**

Para a obtenção de imagens das estruturas especializadas da epiderme de folhas e ápices caulinares (da planta cultivada em casa de vegetação; do clone cultivado *in vitro*: fotoperíodo 16h e fotoperíodo 16h + Luz contínua; do clone aclimatado), as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 6,8 (Karnovsky, 1965), acrescida de 3% de sacarose, durante 12 horas à 4° C. Após lavagem com tampão cacodilato, as amostras foram tratadas com solução aquosa de tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão do fixador, por 2 horas em temperatura ambiente. A seguir foram lavadas em água destilada, desidratadas em soluções com concentrações crescentes de etanol (50% até 100%), e levadas à secagem, ao ponto crítico no Critical Point Dryer – CPD 020 da BALZERS.

Após a montagem das amostras em suportes apropriados, procedeu-se à deposição de ouro metálico, utilizando-se do Sputter Coater SCD 050 da BALZERS, ambos do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB/ UNICAMP.

As amostras foram levadas à observação ao microscópio eletrônico de varredura, marca JEOL, modelo JSM 5800LV do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB/UNICAMP. Os registros fotográficos foram feitos em filme T-MAX 100.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 MESOFILO E NERVURA PRINCIPAL DE FOLHAS ADULTAS:

Folhas adultas de plantas cultivadas em casa de vegetação (planta matriz), observadas em corte transversal, apresentaram mesofilo heterogêneo assimétrico, constituído de 2-3 camadas de parênquima paliçádico, repleto de cloroplastos. A epiderme superior apresentou células arredondadas, maiores do que as da epiderme inferior e os estômatos ocorreram nas duas epidermes, sendo mais numerosos na inferior (fig.3). No material cultivado em casa de vegetação e no clone aclimatado, foi constatada a presença de ducto secretor na nervura principal e na região do floema do feixe vascular secundário (fig.3a,b,e,f) que não foi observado no material cultivado *in vitro*. No mesofilo do clone cultivado *in vitro* não foi possível distinguir o parênquima paliçádico do lacunoso (fig.3d). A epiderme apresentou as mesmas características da planta matriz, sendo que os estômatos eram mais numerosos e freqüentemente abertos (fig.3c,d). No clone aclimatado, o mesofilo apresentou características semelhantes ao da planta matriz, enquanto na nervura principal foi possível observar a presença de numerosas células de paredes espessas, provavelmente fibras, tanto do lado do xilema quanto do floema (fig.3e). Estas células apresentaram forte birrefringência sob luz polarizada (dados não mostrados) e não foram observadas na planta matriz ou nos clones *in vitro*.

O uso do tampão de algodão como forma de vedação resultou em aumento da espessura da folha e alteração do padrão de mesofilo do cultivo *in vitro*. Este tratamento, quando aplicado às plantas cultivadas em fotoperíodo de 16h, favoreceu a diferenciação do parênquimaclorofiliano em paliçádico e lacunoso (fig.4). No mesofilo das plantas cultivadas sob este tratamento também foi possível observar um aumento do número de cloroplastos por célula (fig. 4:b, d).

No tratamento em fotoperíodo 16h./LC foram observadas células mais altas e mais largas na face superior da epiderme em relação ao tratamento onde as plantas foram cultivadas somente em fotoperíodo de 16 horas. Outra diferença foi o número maior de espaços intercelulares no tratamento com LC (fig. 5). O mesofilo de clones cultivados sob fotoperíodo de 16h, com diferentes concentrações de sacarose revelou maiores espaços intercelulares no tratamento com 1% deste carboidrato, em relação aos demais (fig.6). Houve ainda uma alteração na resposta da parede celular à coloração pelo AT, com maior intensidade de coloração na concentração de 3%. A adição de GA<sub>3</sub> não resultou em alterações significativas no mesofilo e nervura principal das amostras analisadas.

#### 4.2 ÁPICES CAULINARES:

Cortes transversais dos ápices caulinares permitiram observar, nos primórdios foliares, tricomas glandulares (TG) (fig.7). e não glandulares (TNG) (fig. 8) em diferentes estágios de desenvolvimento. Os tricomas glandulares (TG) dos primórdios foliares dos clones cultivados *in vitro*, são bisseriados, constituídos de 4-5 pares de células, morfológicamente semelhantes aos tricomas glandulares de *B. tridentata* cultivada em casa de vegetação. Quando corados com AT foi possível visualizar intensa metacromasia das células apicais dos TG, tanto na planta matriz (fig.7a), quanto no clone cultivado *in vitro* (fig.7c). A observação sob luz polarizada permitiu visualizar cristais do tipo drusas, provavelmente de oxalato de cálcio, nas células apicais do tricoma glandular, sendo que, na planta matriz (fig.7 b) eram maiores e mais numerosas do que no clone *in vitro* (fig.7 d).

Observamos na fig. 8 que não houve diferenças morfológicas significativas entre os tricomas não glandulares nos diferentes cultivos, apresentando-se unisseriados, com 6-7 células e um apêndice filamentosso na célula apical. Tanto no cultivo *in vitro* (fig.8c) quanto na planta matriz (fig.8 a), a célula apical corou-se intensamente pelo PAS. Também foi possível

observar que o apêndice filamentososo apresentou forte reação metacromática ao corante AT e reação negativa ao Sudan Black B, no clone aclimatado (fig. 8b, d) e no cultivo *in vitro* (fig. 8 e, f).

As diferentes concentrações de sacarose, 2% e 3%, no meio de cultivo do clone cultivado em fotoperíodo de 16h, não produziram diferenças na coloração dos TG corados com AT (fig. 9a, c). Já no regime de luz que incluiu a luz contínua, observamos que tanto o tratamento que utilizou 2% e 3% de sacarose resultaram em metacromasia (fig.9b, d), sendo mais intensa na concentração de 2% (fig.9d).

Na fig. 10, observamos os TG corados pelo XP, PAS e Sudan Black B. Os TG da planta matriz (fig. 10a), apresentaram coloração alaranjada apenas nas células apicais, enquanto no cultivo *in vitro* (fig.10b,c), quase todas as células eram de cor laranja avermelhada. Nesta coloração ficaram evidentes duas fases do desenvolvimento do TG: Na primeira os TG apresentavam as células apicais exibindo um núcleo volumoso, com citoplasma menos corado (fig. 10b); em outra fase, as células apicais dos TG eram mais densas e homogeneamente coradas, não permitindo a visualização do núcleo e apresentando cutícula distendida (fig.10c).

Quando corados pelo PAS, os TG apresentaram coloração semelhante nos diversos tratamentos e na planta matriz sendo que no cultivo *in vitro* a parede celular das células apicais e o conteúdo celular apresentaram-se mais coradas (fig.10e, f). Para o material cultivado *in vitro*, os diferentes tratamentos realizados afetaram pouco as respostas ao corante.

A coloração pelo Sudan Black revelou nos três cultivos, TG com conteúdo celular corados de marrom escuro e espaço subcuticular devido à distensão da cutícula (fig.10g, h, i), sugerindo a produção de secreção.

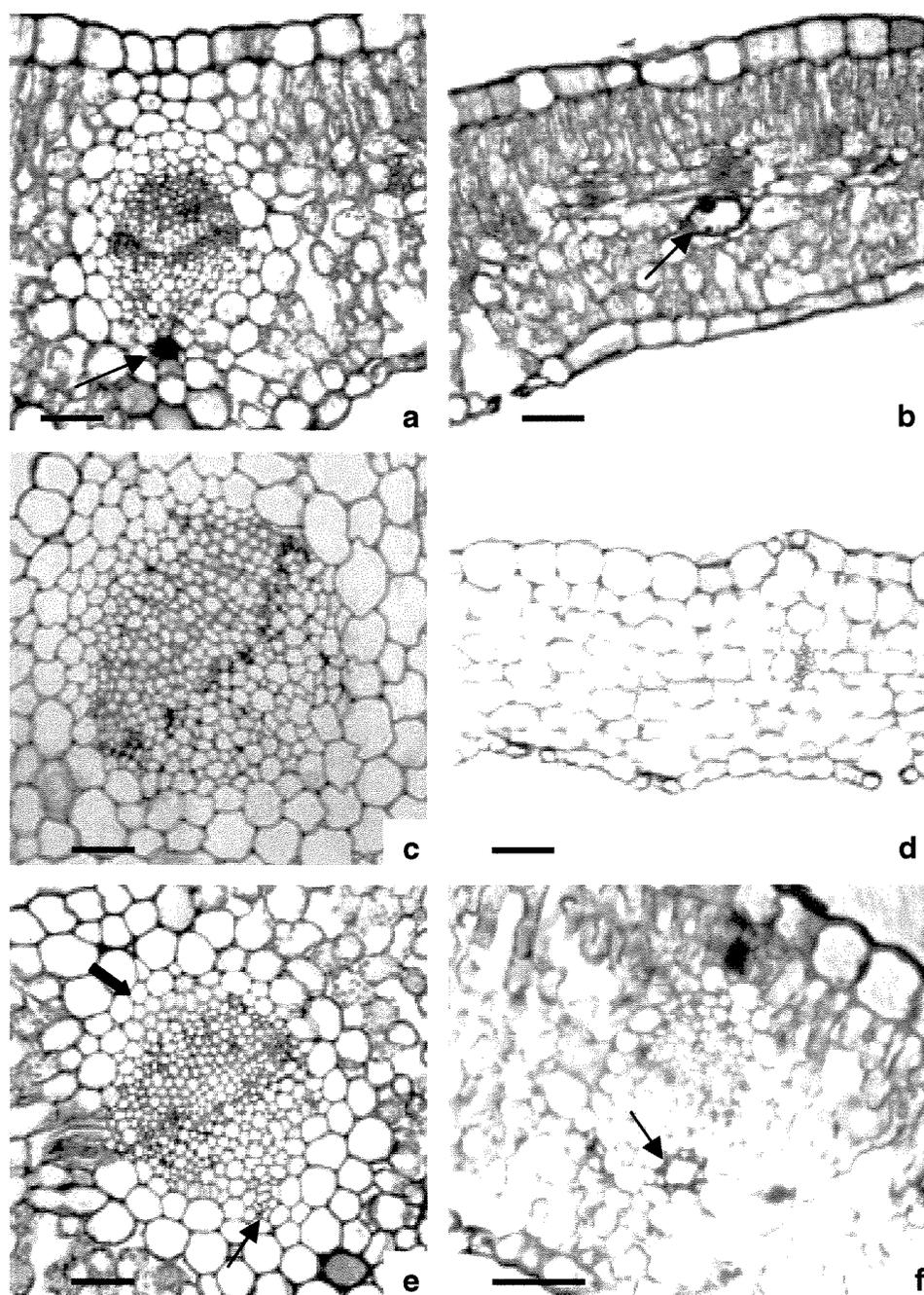
Além das observações sobre os TG e TNG, os cortes transversais de ápices caulinares revelaram no parênquima caulinar a presença de muitos cristais aciculares (raffídeos),

quantidade destes cristais foram insignificantes, sendo que o tratamento que utilizou vedação com tampão de algodão, aumentou um pouco este número (fig.11c). A adição de GA<sub>3</sub> ao meio de cultivo resultou em aumento significativo do número de cristais, principalmente na concentração de 5mg/L (fig.11 e).

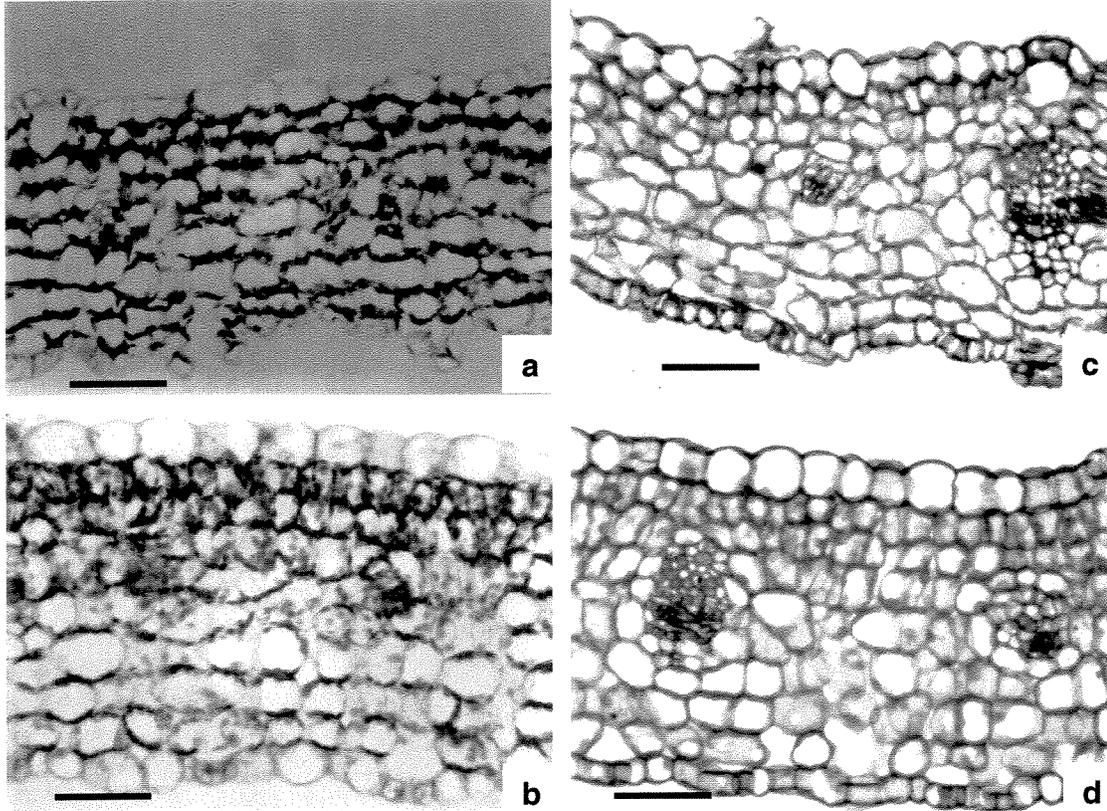
#### **4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV):**

A observação dos primórdios foliares em diferentes estágios de desenvolvimento e da folha adulta através de MEV, permitiu verificar a alta densidade dos tricomas nas folhas mais jovens (fig.12a, b), e a diminuição progressiva à medida que a folha completava o desenvolvimento (fig.12 c). A face superior da epiderme da folha adulta apresentou maior número de tricomas do que a inferior e o inverso foi observado em relação aos estômatos, que estavam em maior número na epiderme inferior. Nas folhas adultas do clone cultivado *in vitro*, a distribuição dos tricomas foi regular e em agrupamentos, sendo os mais comuns constituídos de: um ou dois TG e um ou dois TNG, dispostos juntos (fig. 12 c). Tricomas isolados também foram encontrados. Os dois regimes de luz, no cultivo *in vitro*, não modificaram o padrão de distribuição e a morfologia dos TG e TNG. Foi possível observar o aspecto bisseriado dos TG (fig.12d, e, g, h) e unisseriado dos TNG (fig.12 i), assim como o seu apêndice filamentosso detalhado (fig.12f, i).

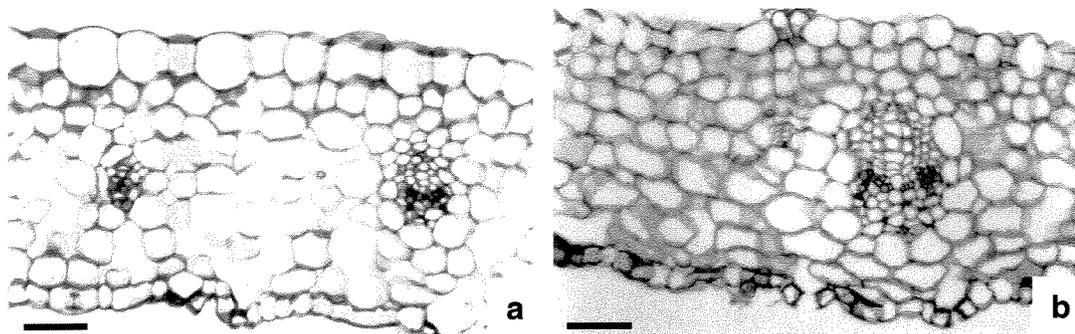




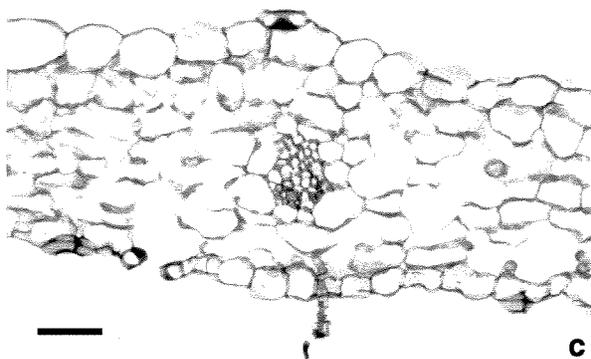
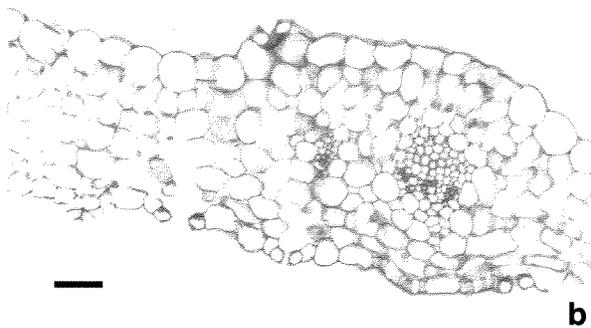
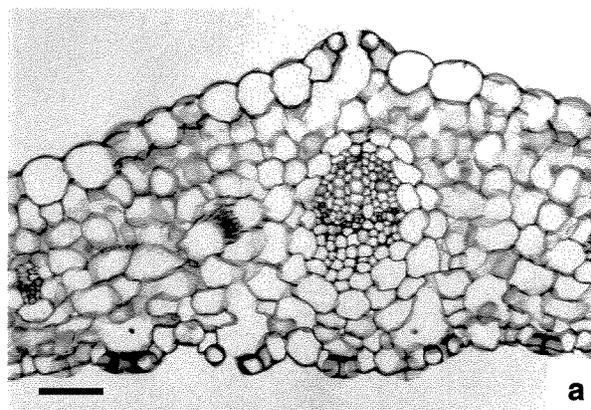
**Figura 3.** Cortes transversais de folhas adultas de *B. tridentata* coradas com AT e Sudan Black B, mostrando a região da nervura principal (a,c,e) e mesofilo (b,d,f). **a-b:** material cultivado em casa de vegetação; **c-d:** clone cultivado *in vitro*; **e-f:** clone aclimatado. Nota-se a presença de ducto secretor (seta fina) na planta matriz e no clone aclimatado; células de parede espessa (e: seta larga). Barra = 50  $\mu\text{m}$  (a – f).



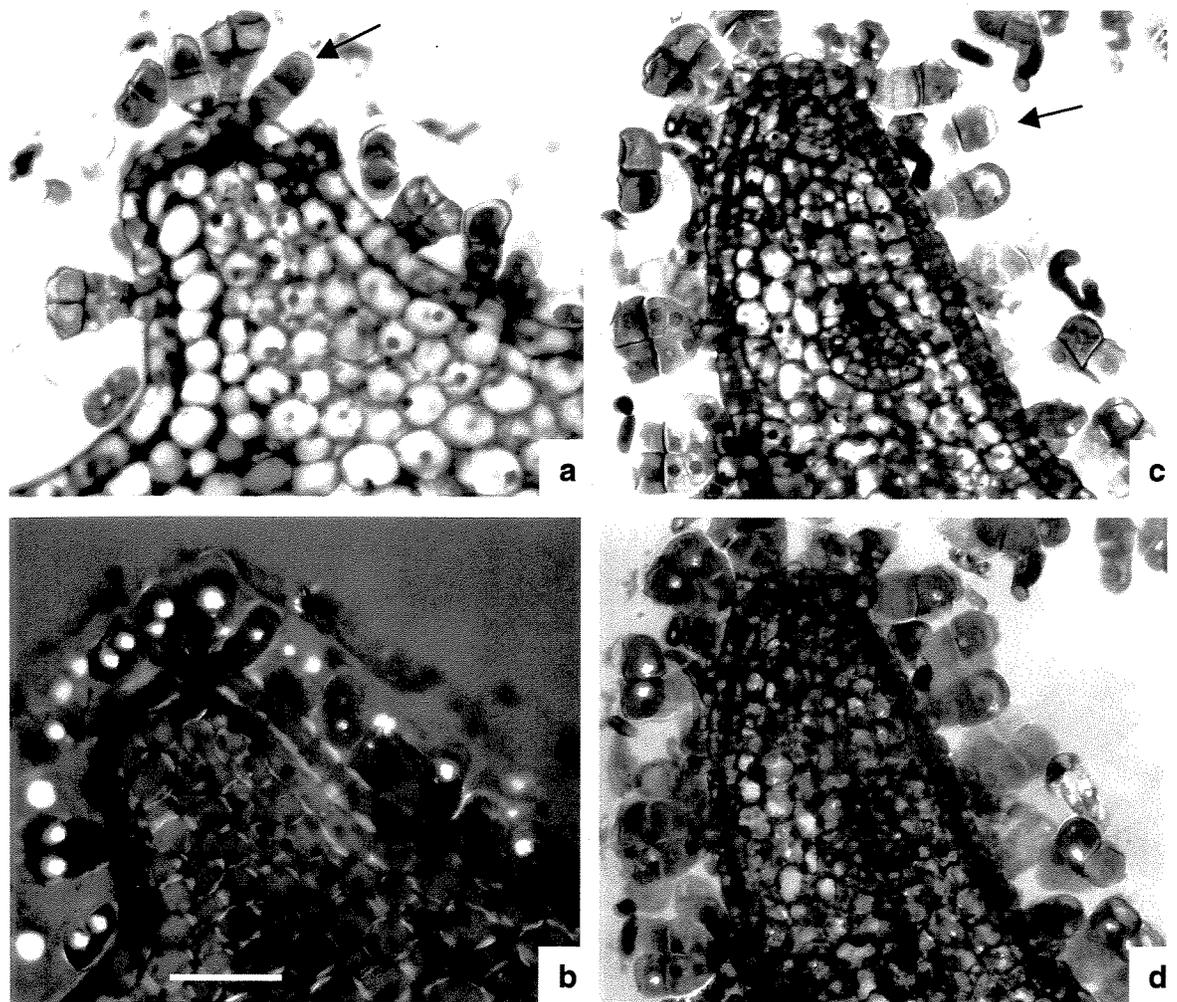
**Figura 4.** Cortes transversais de folhas adultas de clone de *B. tridentata* cultivado *in vitro* e coradas pelo Xylidine Ponceau (a, b) ou pelo Azul de Toluidina (c, d). O material cultivado com a vedação de algodão (b, d) mostrou maior diferenciação do mesófilo com células mais alongadas na face adaxial da folha e mais arredondadas na abaxial, o que não foi observado no material com vedação em PVC (a, c). Barra = 50 µm (de a-d).



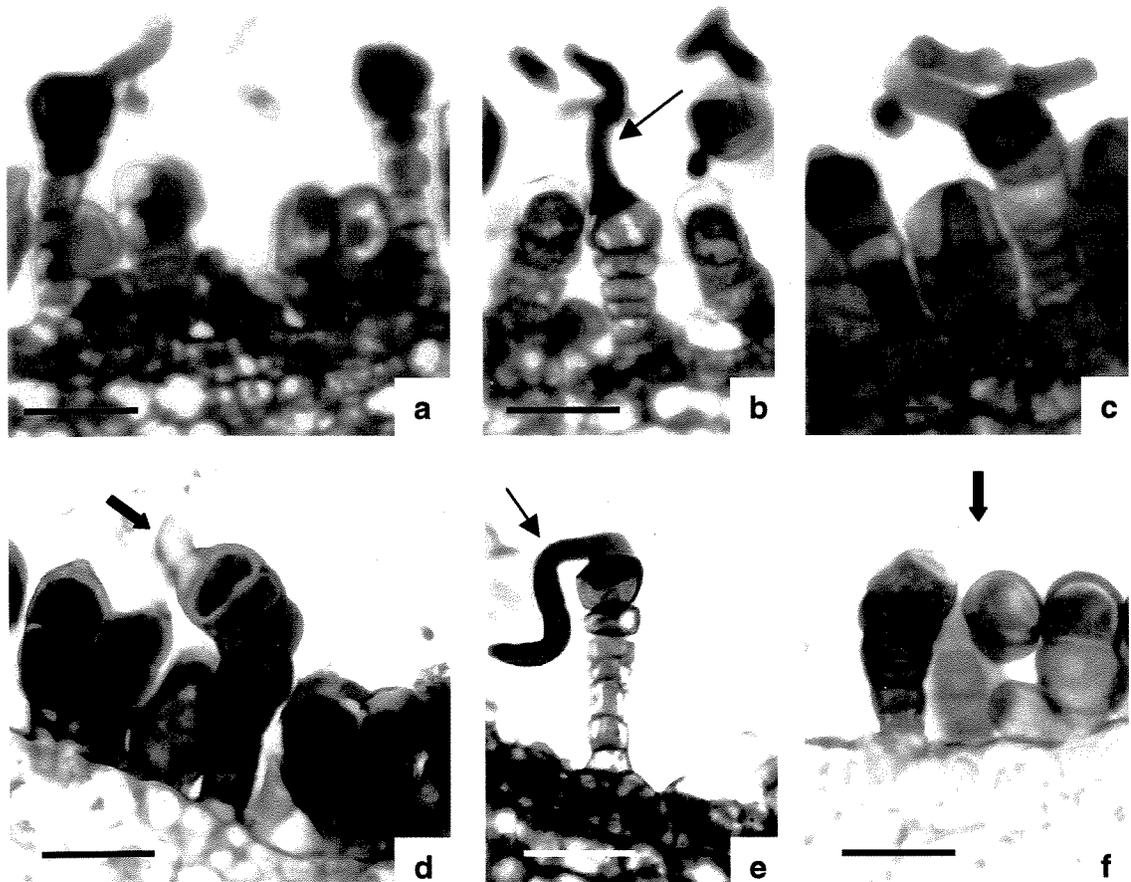
**Figura 5.** Cortes transversais de folhas adultas de *B. tridentata* cultivada *in vitro* em meio MS, com 3% de sacarose sob fotoperíodo de 16 h/ luz contínua (a) e Fotoperíodo de 16 h (b). Nota-se na face superior, células da epiderme maiores (altura e largura) no tratamento com luz contínua. Barra: 50 µm (a, b).



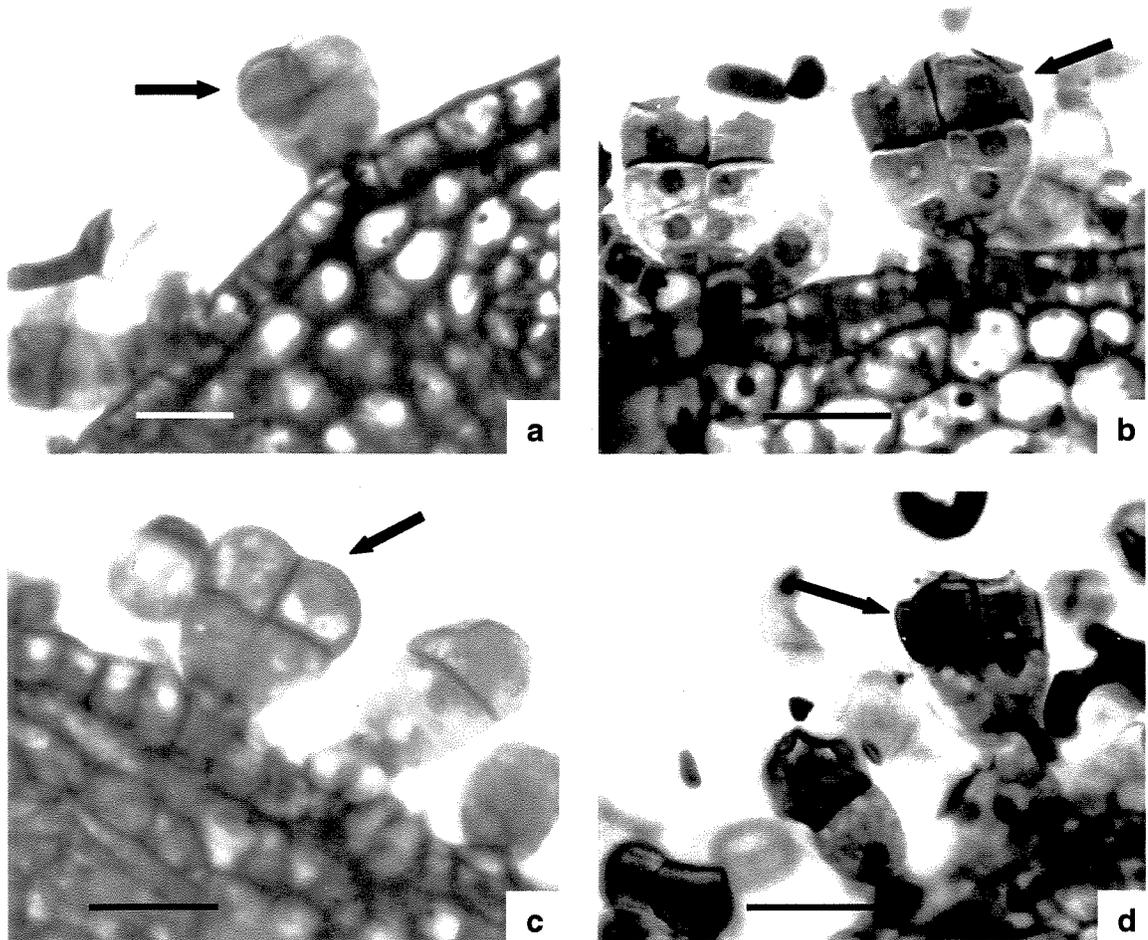
**Figura 6.** Cortes transversais de folhas adultas de *B. tridentata* cultivada *in vitro* em meio MS com 3% de sacarose (a), 2% (b) e 1% (c) . Barra: 50  $\mu$ m (de a-c).



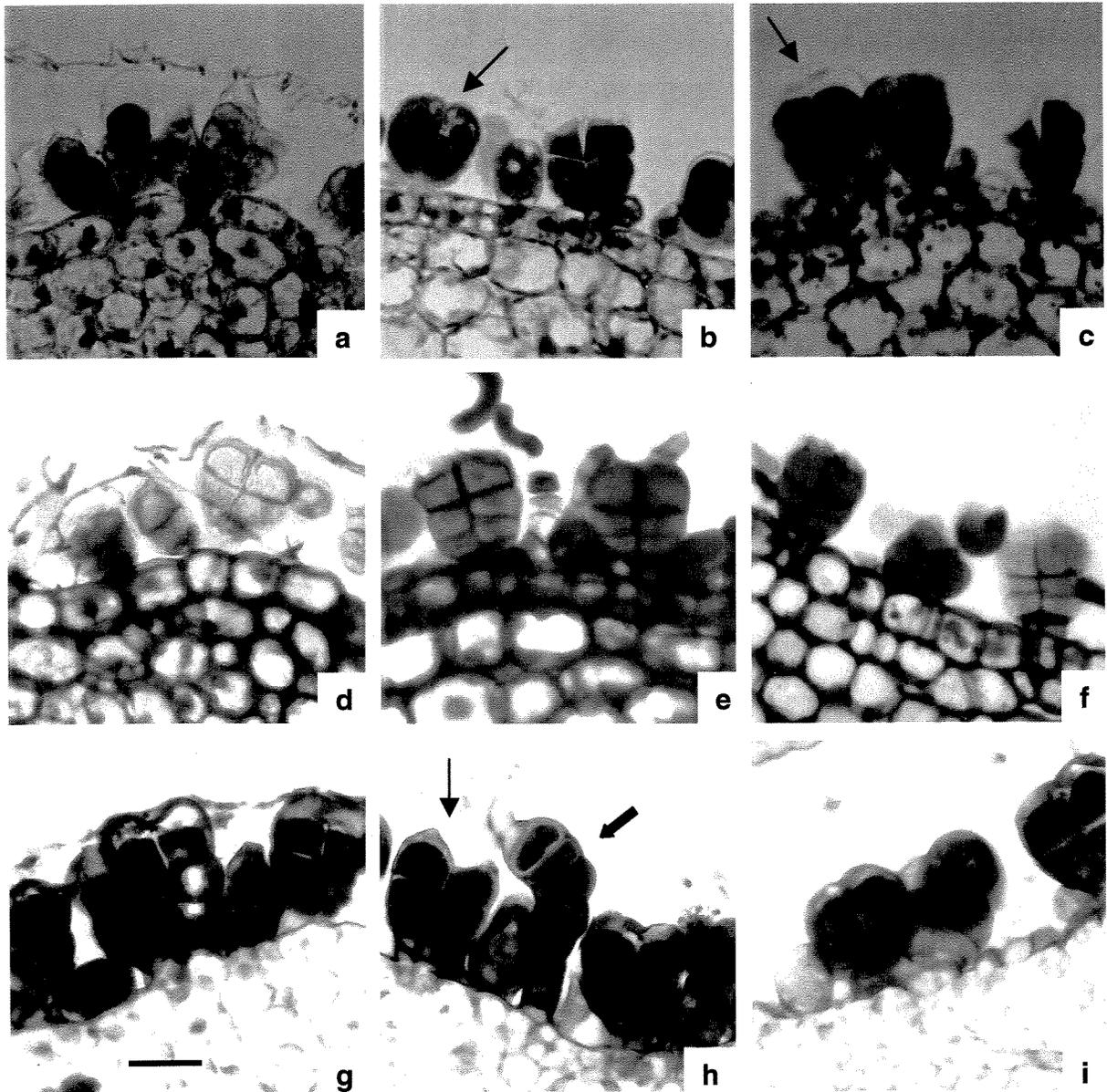
**Figura 7.** Cortes transversais de primórdios foliares do ápice caulinar de *B. tridentata* corados pelo Azul de Toluidina visualizados sob luz comum (**a, c**) ou polarizada (**b, d**). Nota-se a presença de inúmeros tricomas glandulares. **a-b**: Material cultivado em casa de vegetação; **c-d**: Material cultivado *in vitro*. Nota-se a metacromasia das células apicais dos TG (**a, c, setas finas**). Sob luz polarizada foram observados cristais em forma de drusas nas células apicais dos TG, mais abundantes no material oriundo da casa de vegetação. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .



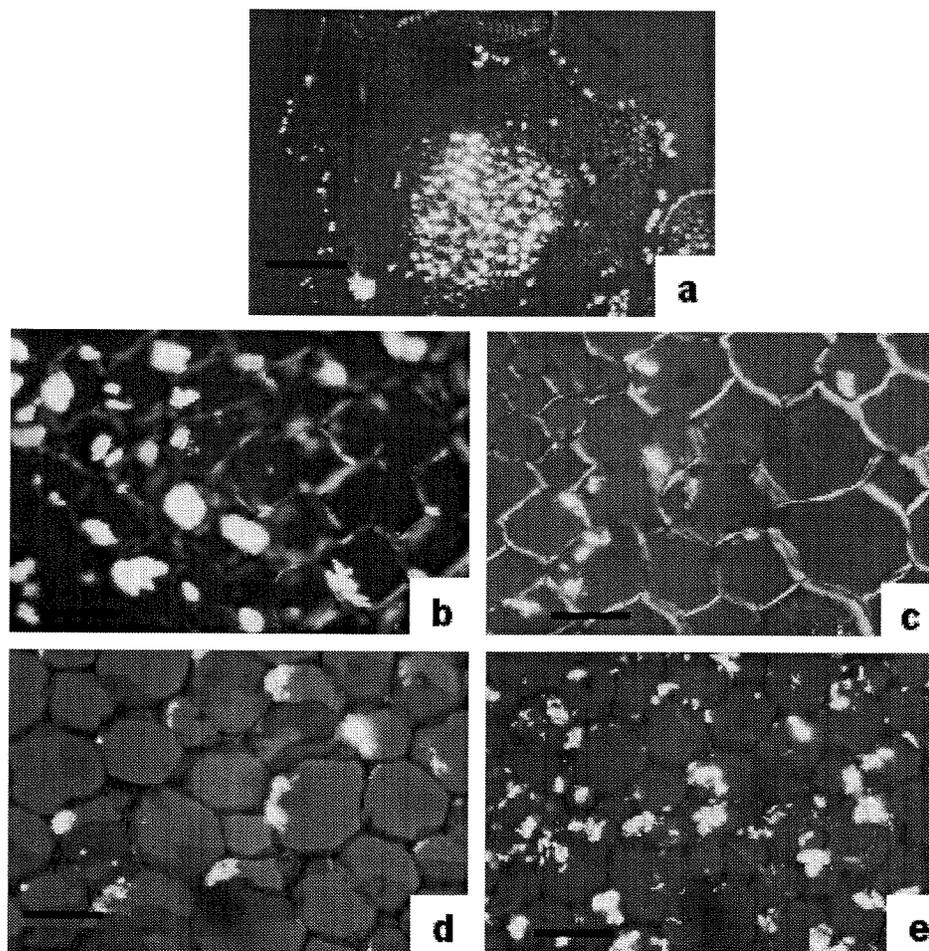
**Figura 8.** Cortes transversais de primórdios foliares de *B. tridentata*: cultivada em casa de vegetação (a); cultivada *in vitro* (c, e, f); e clone aclimatado (b, d). Observam-se tricomas não glandulares corados pelo PAS (a,c); Azul de Toluidina (b, e) e Sudan Black B (d, f). Nota-se forte metacromasia do apêndice filamentosos dos TNG ao corante AT (seta fina) e reação negativa ao Sudan Black B (seta larga). Barra: 25  $\mu$ m (de a-f).



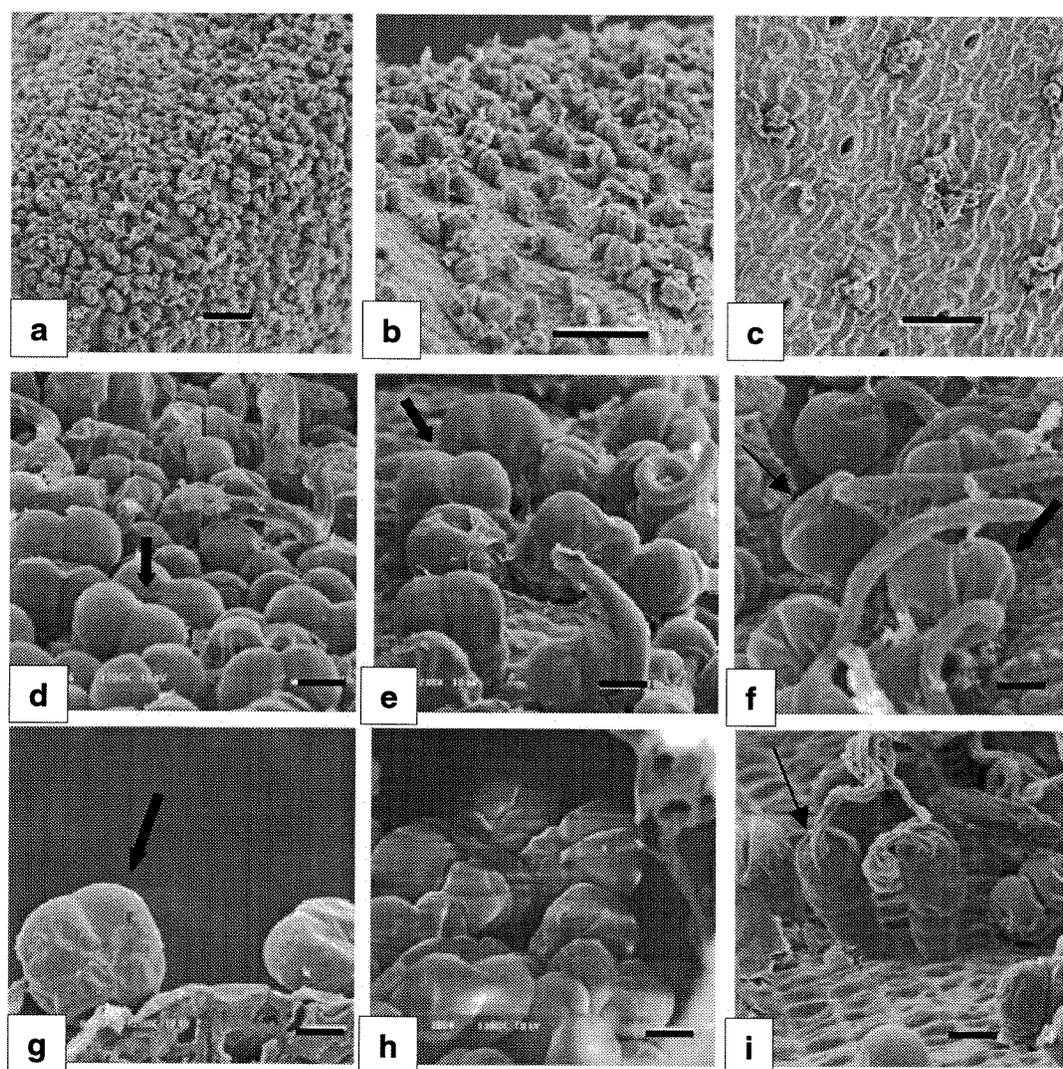
**Figura 9:** Cortes transversais de primórdios foliares de *B. tridentata* cultivada in vitro, mostrando os tricomas glandulares (seta larga) corados pelo Azul de Toluidina. **a:** cultivo sob fotoperíodo de 16h e 3% de sacarose; **c:** fotoperíodo de 16h e 2% de sacarose; **b:** fotoperíodo de 16h /luz contínua e 3% de sacarose; **d:** fotoperíodo de 16h /luz contínua e 2% de sacarose. Nota-se metacromasia ao corante AT nos tratamentos com luz contínua (b,d). Barra = 25 $\mu$ m.



**Figura 10.** Cortes transversais de primórdios foliares de *B. tridentata* mostrando tricomas glandulares corados pelo Xylidine Ponceau (a-c), PAS (d-f), Sudan Black B (g-i). Planta matriz cultivada em casa de vegetação (a, d, g); clone cultivado *in vitro*: sob luz contínua/vedação em PVC (b, e, i), sob LC/vedação em algodão (c, f); clone aclimatado (h). Nota-se tricoma glandular em fase pré-secretora (b: seta fina) e em fase secretora, com cutícula distendida (c: seta fina). Tricoma não glandular (h: seta larga). Barra: 25  $\mu\text{m}$  (de a-i).



**Figura 11.** Cortes transversais de ápices caulinares de *B. tridentata* visualizados sob luz polarizada e mostrando o acúmulo de Raffídeos. **a, b:** material cultivado em casa de vegetação. **c-e:** material cultivado *in vitro*. **c:** sem a adição de GA<sub>3</sub> ao meio de cultivo e vedado com tampão de algodão; **d:** com 1mg/ L de GA<sub>3</sub>; **e:** com 5 mg/L de GA<sub>3</sub>. Nota-se uma maior quantidade de cristais no material cultivado em casa de vegetação e naquele desenvolvido *in vitro* com 5 mg/L de GA<sub>3</sub>. Barra: a: 200 µm; b-e: 50 µm.



**Figura 12.** Imagens dos Tricomas glandulares e não glandulares de *B. tridentata* obtidas através de Microscopia Eletrônica de Varredura. **a-b:** Primórdios foliares de material cultivado *in vitro* mostrando alta densidade de TG e TNG; **c:** Epiderme superior de folha adulta cultivada *in vitro*; **d-g, i:** material *in vitro* mostrando tricomas glandulares bisseriados (setas largas) e tricomas não glandulares (setas finas); **h:** material obtido em casa de vegetação. Barra : a-c: 100 $\mu$ m; d-i: 10 $\mu$ m.

## 5. DISCUSSÃO

O fato do clone cultivado *in vitro* apresentar mesofilo com características distintas ao da planta matriz cultivada em casa de vegetação, evidencia a influência das condições de cultivo na diferenciação dos tecidos foliares. As características do mesofilo observadas no clone de *B. tridentata* cultivado *in vitro*, como a não diferenciação do parênquima clorofiliano, a presença de grandes espaços intercelulares e de poucos cloroplastos, têm sido relatadas em outras espécies por vários pesquisadores (Majada *et al.* 2000; Dimassi-Theriou & Bosabalidis 1997; Wetzstein & Sommer, 1982), e está provavelmente relacionada às condições do cultivo *in vitro*. Apesar do conhecimento de que a anatomia da folha é influenciada por fatores ambientais, incluindo intensidade da luz, umidade, temperatura e condições nutricionais, não estava claro qual destes fatores, especificamente, interferia na anatomia das folhas particularmente no cultivo *in vitro* (Wetzstein & Sommer, 1982).

Os resultados obtidos neste trabalho, com a utilização da vedação em algodão, sugerem que a diminuição de umidade do interior dos frascos de cultivo e a alteração das trocas gasosas, favorecidas por este tratamento, influenciaram positivamente a diferenciação do parênquima clorofiliano. Conforme Esau (1974), o parênquima paliçádico é um tipo especializado de tecido fotossintético, no qual os cloroplastos estão dispostos em uma posição mais favorável em relação à luz. Desta forma, é provável que as plantas cultivadas sob este tratamento podem apresentar atividade fotossintética superior à que normalmente ocorre nas plantas cultivadas *in vitro*. No entanto, para comprovar esta hipótese seria importante a realização de medidas de atividade fotossintética nos dois tratamentos. O fato da concentração de 1% de sacarose ter resultado em aumento dos espaços intercelulares e, portanto, em menor densidade dos tecidos do mesofilo, pode ter sido resultado da diminuição da concentração da fonte de energia e das condições de iluminação e CO<sub>2</sub>, em que as plantas foram cultivadas. Se

considerarmos os resultados obtidos por Woerdenbag *et al.*(1993), no qual foi verificado aumento da atividade fotossintética quando se diminuiu para 1% a concentração de sacarose do meio de cultivo, poderemos supor que as condições de iluminação e CO<sub>2</sub> de nosso experimento foram inadequadas e não favoreceram a realização de fotossíntese pelas plantas cultivadas em concentrações mais baixas da fonte de energia.

Quanto às características da nervura principal, a presença do ducto secretor apenas na planta matriz e no clone aclimatado sugere que o cultivo *in vitro* inibiu a expressão dos genes envolvidos na diferenciação destas estruturas secretoras. A observação de células de parede espessa apenas no clone aclimatado, sugere que a mudança do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* estimulou o desenvolvimento destas estruturas, que não foram observadas na planta matriz. Esta é uma característica interessante, que poderia favorecer a aclimação dos clones, uma vez que estas células devem estar relacionadas com a sustentação das plantas.

Outro fato interessante observado foi a presença maciça de cristais na forma de rafídeos, provavelmente de oxalato de cálcio, nos ápices caulinares da planta matriz, a sua quase ausência no clone cultivado *in vitro* e o aumento significativo destes cristais, após a adição de GA<sub>3</sub>. Cristais de oxalato de cálcio em plantas podem constituir uma forma de armazenar cálcio quando a disponibilidade de cálcio no solo aumenta (Franceschi & Horner, 1980). Além disso, o acúmulo de cristais na forma de rafídeos também tem sido relacionado à defesa contra a herbivoria, repelindo os predadores (Ruiz *et al.*, 2002). O fato do clone cultivado *in vitro* apresentar poucos cristais nos ápices caulinares, sugere que isto ocorreu devido a alta umidade do ambiente *in vitro*, resultando em baixa taxa de transpiração. Desta forma, nossos resultados sugerem um possível efeito de GA<sub>3</sub> no transporte de cálcio via xilema.

A presença de cristais do tipo drusas nas células apicais dos tricomas glandulares tem sido relatada por vários pesquisadores ( Ascensão & Pais, 1987; Nielsen *et al.*, 1991; De Silva

*et al.*, 1996). Estudos recentes têm relacionado o aumento na concentração do cálcio nos espaços intercelulares da folha com a redução da abertura estomatal, afetando conseqüentemente a entrada de CO<sub>2</sub> e a eficiência fotossintética (Ruiz & Mansfield, 1994; De Silva *et al.*, 1996). A planta possui mecanismos para proteger as suas células guarda de altas concentrações de cálcio provenientes do fluxo de transpiração. Os tricomas da epiderme de partes aéreas teriam importante papel no equilíbrio iônico, sequestrando cálcio em excesso, na forma de cristais, nos vacúolos de suas células (De Silva *et al.* 1996). *In vitro*, analogamente ao que foi discutido em relação aos rafideos, as plantas apresentaram menor número de drusas, devido às características de baixa transpiração deste cultivo.

O corante AT tem sido empregado para identificar grupos aniônicos, em especial os grupos fosfato dos ácidos nucléicos e carboxila de açúcares ácidos como as substâncias pécnicas das paredes celulares vegetais. Na maioria dos poliânions, como as pectinas, ocorre o fenômeno da metacromasia e a coloração se torna mais arroxeadada, chegando a magenta em casos extremos (Silva *et al.* 1997). Neste tipo de reação, tem sido relatado que taninos coram em verde, devido à presença de polifenóis (O'Brien *et al.*, 1964, citado por Gahan, 1984). Esta coloração verde foi observada nas células basais dos TG, apenas na planta matriz e no clone aclimatado, sugerindo que estes compostos estavam ausentes ou em quantidade pequena nos clones cultivados *in vitro*. Já com relação a presença de pectinas, ela foi favorecida no cultivo *in vitro*.

A diferença de intensidade da cor arroxeadada nas reações metacromáticas com AT, observada no cultivo *in vitro* (Luz contínua) com 2 e 3% de sacarose, pode ter sido resultado de alterações no metabolismo causadas pela redução da concentração de sacarose. Segundo alguns estudos a diminuição da concentração de sacarose no meio de cultivo pode estimular a biossíntese da clorofila e a fotossíntese (Edelman & Hanson, 1972). Neste caso, podemos sugerir também que com 2% de sacarose no meio de cultivo, a quantidade de pectinas foi

aumentada ou houve uma desmetilação de moléculas pré-existentes, o que é comum em tecidos em crescimento (Carpita e McCann, 2000).

XP é um corante ácido, que cora as proteínas protonadas no pH em que a reação se realiza (Vidal, 1970). A coloração pelo XP permitiu a visualização de núcleo e nucléolo nas células apicais de alguns tricomas glandulares, sendo que em outros, todo o citoplasma ficou corado homogeneamente em laranja, não permitindo a observação do núcleo. Segundo estudos de Ascensão *et al.* (1997), os TG apresentam três fases morfológicamente distintas: fase pré-secretora, com núcleo grande e nucléolo proeminente; fase secretora caracterizada pela distensão da cutícula; fase pós-secretora, com intensa vacuolização e degeneração das células glandulares. Os resultados do nosso experimento sugerem que o cultivo *in vitro* não impediu o desenvolvimento destas três fases do desenvolvimento dos tricomas glandulares, que normalmente ocorrem nas plantas *in vivo*. Além disso, o tratamento em que se utilizou o tampão de algodão, e que favoreceu a diferenciação do parênquima clorofiliano, também favoreceu o desenvolvimento de grande número de TG com a cutícula distendida, sugerindo que estavam na fase secretora. A observação da coloração homogênea com XP, sem a visualização do núcleo, sugere que o tricoma pode estar na fase secretora. Em tricomas de *Achillea*, o núcleo degenera conforme a secreção se inicia (Stahl, 1953, citado por Petersen & Vermeer, 1984).

A reação de PAS pode ser utilizada para identificar polissacarídeos presentes na secreção dos TG (Ascensão & Pais, 1987; Petersen & Vermeer, 1984). A coloração PAS positiva dos tricomas glandulares nos três tipos de cultivo sugere a presença de polissacarídeos no material secretado e na parede celular (Cortelazzo, 1992).

Sudan Black B cora todos os lipídios que são líquidos e hidrofóbicos, além dos fosfolipídios insolúveis. Neste corante os lipídios apresentam cor preta ou azul escuro, e alguns fosfolipídios podem exibir coloração marron escuro (Gahan, 1984). Os TG de *B.*

*tridentata* nos três cultivos apresentaram reação positiva ao corante, sugerindo a presença de lipídios. Desde que foi verificado que os TG são PAS positivos, os resultados sugerem que uma mistura de substâncias lipofílicas e hidrofílicas pode estar presente.

O fato dos tricomas foliares das plantas cultivadas em meio contendo GA<sub>3</sub>, não apresentarem alterações nas reações histoquímicas, quando comparados com o controle, pode ter sido resultante do período de cultivo. Segundo Endress (1994), a capacidade de produção de compostos secundários é influenciada pelo desenvolvimento ou idade fisiológica da planta.

As observações através da microscopia eletrônica de varredura, permitiram a visualização dos tricomas, assim como a diminuição da frequência conforme a folha se desenvolvia. O aspecto fibrilar do apêndice filamentosos dos tricomas não glandulares ficou bem evidente através desta técnica.

## 6. CONCLUSÕES

Plantas do clone de *B. tridentata* cultivadas *in vitro* apresentaram TG morfológicamente semelhantes aos da planta matriz cultivada em casa de vegetação e aos do clone aclimatado. A vedação com tampão de algodão influenciou a diferenciação do parênquima clorofiliano, provavelmente por alterar as trocas gasosas e diminuir a umidade no interior dos frascos de cultivo. Neste tratamento, os TG apresentaram maior diferenciação, evidenciada pela cutícula distendida, sugerindo a ocorrência de secreção. Também foi observado o efeito da LC e da diminuição da concentração de sacarose (2%) no meio de cultivo, nas reações histoquímicas dos TG, que apresentaram maior metacromasia nas células apicais, quando corados com AT.

A alteração das condições microambientais influencia a diferenciação *in vitro*, abrindo possibilidades para melhorar a produção de compostos secundários através da cultura de partes aéreas, assim como aumentar a porcentagem de sobrevivência dos clones aclimatados.

## **CAPÍTULO IV**

**ESTUDO DA DENSIDADE DOS TRICOMAS FOLIARES EM *Baccharis tridentata*:  
PLANTA CULTIVADA EM CASA DE VEGETAÇÃO, CLONE CULTIVADO *IN*  
*VITRO* E CLONE ACLIMATADO.**



## RESUMO

*Baccharis tridentata* Vahl. é uma planta nativa, aromática e de uso medicinal. O nerolidol é um dos componentes sesquiterpênicos do óleo essencial desta espécie, sendo que recentemente foi comprovada a atividade antimalárica deste composto. Muitos compostos potencialmente úteis são acumulados em tricomas glandulares (TG), estruturas especializadas da epiderme de várias plantas. Uma das estratégias para aumentar a produção destes compostos seria aumentar o número dos TG; sendo que a cultura de partes aéreas (“shoot cultures”) constitui uma alternativa para a produção de compostos acumulados nestas estruturas. A comparação da densidade dos TG em *B. tridentata* nos três cultivos, permitiu verificar que não houve diferença significativa entre o seu número na planta matriz mantida em casa de vegetação e no clone aclimatado, enquanto o cultivo *in vitro* resultou em densidade significativamente menor. Várias alterações das condições do microambiente foram realizadas no sentido de otimizar a densidade dos TG no clone cultivado *in vitro*. Um efeito positivo da luz contínua no número de TG foi constatado, sem igualar, no entanto, aquele encontrado na planta matriz. Nesta comparação é importante considerar que o tempo de cultivo *in vitro* (31 dias) foi muito menor que o da planta matriz. Embora apenas o aumento do número de TG não signifique aumento da capacidade biossintética, estes resultados abrem novas perspectivas para a otimização da produção de compostos secundários em cultura de partes aéreas, inclusive se considerarmos que melhores resultados poderão ser obtidos com aumento do tempo de exposição aos tratamentos realizados.

## 1. INTRODUÇÃO

Tricomas são estruturas unicelulares ou multicelulares, que se originam de células protodérmicas, e compõem o indumento do vegetal. Podem ser classificados em tricomas glandulares (TG) e não glandulares (TNG) (Cutter, 1978; Wagner, 1991). Os tricomas glandulares que secretam substâncias lipofílicas ocorrem em várias famílias, como Lamiaceae, Asteraceae, Geraniaceae, Solanaceae e Cannabinaceae e podem desempenhar várias funções relacionadas com as interações da planta com o meio ambiente (Wagner, 1991; Fahn, 2000). A composição química das substâncias secretadas pelos TG de espécies destas famílias é muito variada e complexa. Compostos químicos produzidos por várias vias biossintéticas podem estar presentes e entre os compostos lipofílicos, os terpenóides e seus derivados parecem ser predominantes (McCaskill & Croteau, 1999). Estudos analíticos têm demonstrado que em geral os tricomas glandulares contêm monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos característicos da planta (Kelsey *et al.*, 1984).

Alguns terpenos de grande valor econômico são: mentona, mentol e carvona, monoterpenos presentes no óleo essencial de *Mentha sp*, utilizado como flavorizante, aditivo em alimentos, em produtos de higiene bucal e em preparações farmacêuticas (Simões & Spitzer, 1999). Outro exemplo é a artemisinina, uma lactona sesquiterpênica que apresenta atividade antimalárica, encontrada exclusivamente nos TG de *Artemisia annua*, (Duke *et al.*, 1994), constituindo um importante medicamento, principalmente no tratamento das formas mais graves da malária.

Existe grande probabilidade dos compostos fitotóxicos, seqüestrados nos TG, apresentarem atividade biológica. O potencial antibiótico e antimicrobiano do material secretado pelos TG tem sido reconhecido há muito tempo (Kelsey *et al.*, 1984; Wagner, 1991). Nos últimos anos, tem havido grande interesse em aumentar a produção de compostos naturais

de valor econômico (Balandrin *et al.*, 1985), muitos dos quais são localizados nos tricomas glandulares (Duke *et al.*, 2000). A biotecnologia oferece algumas vantagens sobre o cultivo tradicional, como ausência de doenças, problemas climáticos, e a possibilidade de se aumentar a produção e alterar a qualidade, através da manipulação ambiental e do meio de cultivo (Tabata, 1977; Endress, 1994; Alfermann & Petersen, 1995). O potencial das culturas de partes aéreas (“shoot cultures”) produzirem compostos economicamente importantes tem sido constatado (Heble, 1985), inclusive com a produção do composto desejado em quantidades similares à produzida no cultivo tradicional (Hitmi *et al.*, 1999).

Para aumentar a produção de compostos produzidos nos tricomas, duas estratégias podem ser consideradas: aumentar a capacidade biossintética e/ou aumentar a densidade (número TG/mm<sup>2</sup>) dos tricomas (McCaskill & Croteau, 1999; Duke *et al.*, 2000; Veronese *et al.*, 2001).

O potencial desta estratégia tem sido desenvolvido pela recente identificação de alguns genes que regulam a diferenciação e desenvolvimento dos tricomas não glandulares em *Arabidopsis* (Brassicaceae). Foram identificados os genes GLABROUS1 (GL1) E TRANSPARENT TESTA GLABRA (TTG), requeridos para iniciação dos tricomas (Larkin *et al.*, 1994; Hülskamp *et al.*, 1994). O gene TTG pode também desempenhar um papel na regulação do espaçamento dos tricomas, através da ativação de outro gene TRIPTYCHON (TRY), que responderia sintetizando um inibidor. Este inibidor impediria que células próximas da epiderme se desenvolvessem em tricomas, garantindo um espaçamento entre eles (Hülskamp *et al.*, 1994).

A densidade dos TG tem sido investigada em várias espécies de plantas. Nas folhas, as duas faces apresentam diferentes densidades, conforme a espécie analisada. Em *Artemisia campestris* (Asteraceae), os tricomas bisseriados ocorrem em ambas as faces, mas em maior quantidade na superior (Ascensão & Pais, 1987). Quando há dois tipos de TG, a distribuição

pode ser diferente para cada tipo. É o que ocorre em *Mentha* (Lamiaceae), na qual os tricomas do tipo capitado ocorrem em maior densidade na epiderme da face superior, enquanto os do tipo peltado, predominam na epiderme da face inferior (Maffei & Sacco, 1987). Já em *Nepeta racemosa*, outra Lamiaceae, os TG são mais numerosos na epiderme inferior (Bourett *et al.*, 1994). Diferenças fisiológicas entre as duas faces resultariam na supressão ou estímulo do desenvolvimento dos tricomas. As duas faces podem apresentar sensibilidade diferenciada às giberelinas endógenas (Chien & Sussex, 1996), o fitohormônio que tem sido relacionado com o desenvolvimento dos tricomas, em *Arabidopsis* (Chien & Sussex, 1996; Perazza *et al.*, 1998).

Outra questão que tem sido discutida refere-se ao número dos tricomas ser fixo ou aumentar durante o desenvolvimento da folha. Ascensão & Pais (1987) constataram em *Artemisia campestris* que o número de tricomas é estabelecido já no início da diferenciação da folha, enquanto outros autores (Turner *et al.*, 1980; Maffei *et al.*, 1986) verificaram em espécies de *Cannabis* e *Mentha* que ele aumenta durante o desenvolvimento foliar.

Pesquisas visando aumentar a densidade dos TG têm sido desenvolvidas através do cultivo tradicional (Liersch *et al.*, 1986; Bosabalidis & Exarchou, 1995), e também através do cultivo *in vitro* (Sudriá *et al.*, 2001).

A formação dos estômatos e dos tricomas nas epidermes da planta são exemplos de diferenciação de algumas células de um conjunto aparentemente homogêneo. Segundo Cutter (1978), este fenômeno ocorre com um certo grau de ordem, resultando em um padrão de espaçamento, onde se observa uma distância mínima entre as estruturas diferenciadas.

O desenvolvimento de um tricoma pode ser considerado um processo de morfogênese celular (Hulskamp *et al.*, 1994) e apesar dos avanços na identificação dos genes envolvidos, muitos mecanismos relacionados com a expressão gênica precisam ser elucidados. A interação dos genes entre si e com outros fatores do metabolismo e do ambiente

é complexa, sugerindo que a planta é capaz de realizar um ajuste delicado da distribuição dos tricomas. Parece existir um grau de plasticidade que pode ser explorado para interferir no desenvolvimento dos tricomas (Duke *et al.*, 2000).

*B. tridentata* é uma espécie aromática cujo óleo essencial contém monoterpenos e sesquiterpenos; dentre estes, destacam-se o espatulenol (8,6%) e o nerolidol (4,6%) (Ferracini *et al.*, 1996). Pesquisas recentes verificaram a atividade antimalárica do nerolidol, sugerindo potencial aplicação terapêutica (Lopes *et al.*, 1999; Macedo *et al.* 2002). *B. tridentata* apresenta TG e TNG característicos nas superfícies de suas partes aéreas (Castro, 1987).

A micropropagação desta espécie foi previamente estabelecida (Kajiki & Shepherd, resultados apresentados no cap.1), permitindo a formação de um banco de plantas homogêneas e a sua utilização no estudo da influência de alguns fatores sobre a densidade dos tricomas foliares.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

1. Comparar a densidade dos tricomas foliares (TG e TNG) de *B. tridentata* em plantas submetidas a diferentes formas de cultivo: em casa de vegetação, clone cultivado *in vitro* e clone aclimatado.

2. Avaliar os efeitos:

2.1. da interação do fotoperíodo e diferentes níveis de sacarose,

2.2. da temperatura e umidade do micro ambiente,

2.3. de duas concentrações de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>),

na densidade dos TG foliares de um clone de *B. tridentata* cultivado *in vitro*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL BOTÂNICO:

(Ver fig. 1 do capítulo III – Esquema de coleta de amostras)

3.1.1. Indivíduos de *B. tridentata* procedentes do Parque Nacional de Itatiaia foram transplantados (Maio de 2000) para casa de vegetação e canteiro do DFV/IB. As folhas adultas utilizadas na contagem dos tricomas foram coletadas de plantas com cerca de 18 meses de cultivo em casa de vegetação.

3.1.2. Material homogêneo: Clone de *B. tridentata* foi cultivado e micropropagado, via inoculação de ápices caulinares, em meio MS básico, pH 5,8 e 3% de sacarose, solidificado com 2,5 g/L de Phytigel, em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 h, à temperatura de 25-27° C. As amostras foram coletadas de clones com 31 dias de cultivo *in vitro*.

3.1.3. Clone aclimatado: Clones de *B. tridentata* cultivados *in vitro* em meio MS básico foram aclimatados para condição *ex vitro* e mantidos em casa de vegetação. As plantas foram utilizadas após 6 meses da aclimação.

#### 3.2. TRATAMENTOS

Em todos os experimentos os explantes utilizados foram ápices caulinares ( $\pm$  1,2cm de altura e 3 folhas jovens) de um clone de *B. tridentata* com 31 dias de idade. Eles foram cultivados nas seguintes condições e analisados após 31 dias:

### **3.2.1 EFEITO DO FOTOPERÍODO X SACAROSE:**

Os explantes foram inoculados em meio MS básico com 3%, 2% e 1% de sacarose e cultivados durante 31 dias sob fotoperíodo de 16h e à temperatura de 25-27°C. Parte do material foi submetido à luz contínua (LC) após 15 dias do início do experimento. Deste modo foram realizados 6 tratamentos:

T1 (Controle): Meio MS com 3% Sacarose, Fotop.16h.

T2: Meio MS com 3% sacarose, Fotop.16h/LC.

T3: Meio MS com 2% de sacarose, Fotop.16h.

T4: Meio MS com 2% de sacarose, Fotop.16h./LC

T5: Meio MS com 1% de sacarose, Fotop. 16h.

T6: Meio MS com 1% de sacarose, Fotop.16h./LC.

### **3.2.2. EFEITO DO ABAIXAMENTO DA TEMPERATURA:**

Os explantes foram cultivados sob fotoperíodo 16h/ LC; e à temperatura de 25-27°C, nas seguintes condições:

Tratamento 1.: No 14º dia do cultivo, as plantas foram submetidas à abaixamento da temperatura, permanecendo durante uma hora em temperatura de 6-8°C. Após este período, retornaram à temperatura de 25-27°C.

Tratamento 2.: No 14º dia do cultivo, as plantas foram submetidas à abaixamento de temperatura, permanecendo durante 24 horas em temperatura de 6-8°C. Após este período, retornaram à temperatura de 25-27°C.

Foram realizadas 5 repetições/ tratamento.

### **3.2.3 EFEITO DA VEDAÇÃO DO FRASCO DE CULTIVO**

Os explantes foram cultivados sob fotoperíodo 16h/ LC; e temperatura: 25-27°C, nas seguintes condições:

Tratamento 1: Vedação com PVC, utilizada em todos os demais tratamentos

Tratamento 2: Vedação com tampão de algodão e gaze. Os explantes submetidos à este tratamento ficaram os dez dias iniciais do cultivo com vedação de PVC. No décimo primeiro dia, sob condições assépticas, o PVC foi substituído pelo tampão de algodão, permanecendo até o final do experimento com esta vedação. Foram realizadas 5 repetições/tratamento.

### **3.2.4 EFEITO DA ADIÇÃO DE GA<sub>3</sub>**

Os explantes foram cultivados sob fotoperíodo 16h/ LC; e temperatura: 25-27°C, nos seguintes experimentos:

Tratamento 1: Meio MS básico com 1mg/L de GA<sub>3</sub>

Tratamento 2: Meio MS básico com 5mg/L de GA<sub>3</sub>

Foram realizadas 5 repetições/tratamento.

### **3.3. AMOSTRAS UTILIZADAS:**

Após 31 dias de cultivo 3 plantas de cada tratamento foram separadas aleatoriamente. Uma folha adulta do 6° ou 7° nó (do ápice para a base), totalmente expandida e apresentando aproximadamente 1,6 cm de comprimento x 0,7 cm de largura foi coletada de cada planta, totalizando três repetições (folhas) /tratamento.

### **3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS:**

As folhas coletadas foram fixadas em FAA (Johansen, 1940) durante 24 horas, à vácuo, e armazenadas em etanol 70%.

Após 1 semana, as folhas foram submetidas à hidratação em série etílica para serem diafanizadas. A técnica de clarificação foi realizada segundo Shobe & Lersten, 1967, modificado por Monteiro *et al.*, 1979. Folhas inteiras foram tratadas com solução de hidróxido de sódio 5% durante aproximadamente 1 hora, e hipoclorito de sódio 5% durante 10-12 horas. Várias lavagens com água destilada foram realizadas após o primeiro e o segundo tratamentos. As folhas foram coradas com safranina aquosa e montadas entre lâmina e lamínula em glicerina.

### **3.5 CONTAGEM DOS TRICOMAS**

A contagem dos TG e TNG foi realizada nas duas faces da folha, em microscópio Carl Zeiss portador de câmara clara. As observações foram feitas em aumento de 100 vezes. A área de 1mm<sup>2</sup> na região mediana da folha para contagem dos tricomas foi estabelecida através da projeção de lâmina micrométrica.

### **3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise de variância (ANOVA) foi realizada através do programa de estatística SYSTAT 9 (SPSS Inc. 1998).

A comparação entre as médias (Teste de Tuckey) foi obtida através do programa VARPC desenvolvido pelo Prof. Dr. Ladaslav Sodek, do Departamento de Fisiologia Vegetal/ UNICAMP.

#### 4. RESULTADOS

Através dos estudos de densidade que foram realizados, observamos que os TG na planta matriz, apresentavam-se agregados em grupos de até 5 TG, sendo mais comuns, os de 3 ou 4. No clone aclimatado, o mesmo foi observado, sendo que os grupos de 3 TG predominaram. Já no clone cultivado *in vitro*, ocorreram grupos de até 3 TG, sendo que os grupos de 2 TG ocorreram em maior número.

Uma maior densidade dos TG foi observada na epiderme da face superior da folha (FS), independente do cultivo, sendo os valores significativamente diferentes ( $P < 0,001$ ). Considerando as duas faces, diferença significativa no número de TG não foi constatada, entre a planta matriz (casa de vegetação) e o clone aclimatado. Já o clone cultivado *in vitro* apresentou uma densidade menor (Tuckey 0,1%) (fig.1).

Com relação à densidade dos TNG, não houve diferença significativa entre as duas faces, nos três cultivos avaliados; inclusive, no cultivo *in vitro*, a face inferior (FI) apresentou valores pouco superiores, mas não significativos estatisticamente, em relação à FS. Já o tipo de cultivo influenciou significativamente o número dos TNG. A análise das duas epidermes demonstrou que a planta matriz produziu TNG em nº significativamente maior (Tuckey 0,1%) (fig. 2).

O efeito da interação entre concentração de sacarose no meio de cultivo x fotoperíodo, na densidade dos TG em clones cultivados *in vitro*, pode ser verificado na fig.3. Observamos que a concentração de sacarose no meio de cultivo não afetou a densidade dos TG dos clones cultivados em fotoperíodo de 16 horas. O efeito positivo da luz contínua foi observado nas plantas cultivadas no tratamento sob fotoperíodo 16 h (nos 15 dias iniciais)/luz contínua (nos 16 dias finais do cultivo). Valores significativamente maiores (Tuckey 0,1%) de TG foram constatados tanto na face superior quanto na inferior, nas plantas cultivadas com 3% de

sacarose tanto em fotoperíodo de 16h como em luz contínua. Na concentração de 2% de sacarose, o período de LC, aumentou a densidade de TG, apenas na face inferior.

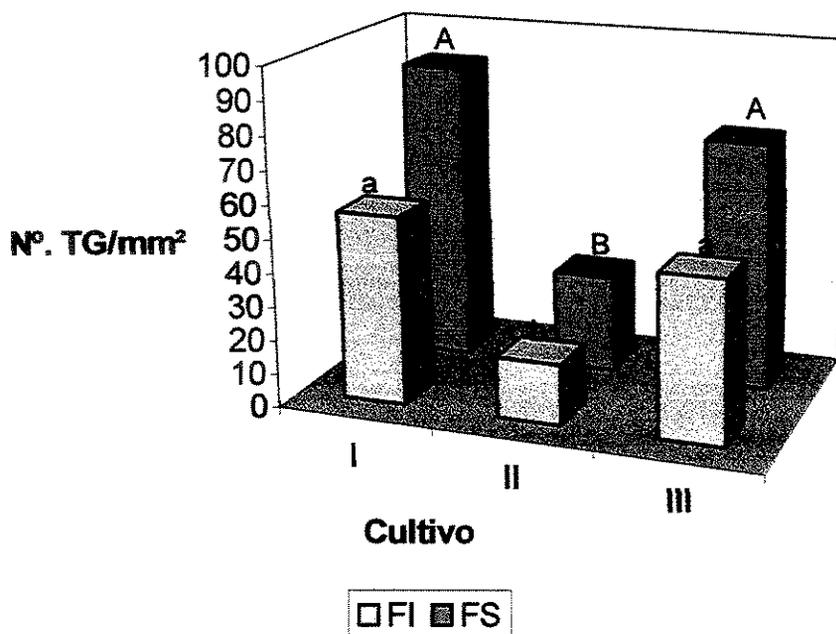
Com o objetivo de verificar se o efeito positivo da luz contínua (LC) no número de TG poderia ser potencializado por outros fatores, os demais tratamentos foram realizados.

Os resultados do efeito do abaixamento da temperatura na densidade dos TG estão apresentados na fig. 4. Verificamos que na face superior houve uma tendência de diminuição do número de TG, após o tratamento em que as plantas foram submetidas à temperatura de 6-8°C durante 24 horas em relação ao controle.

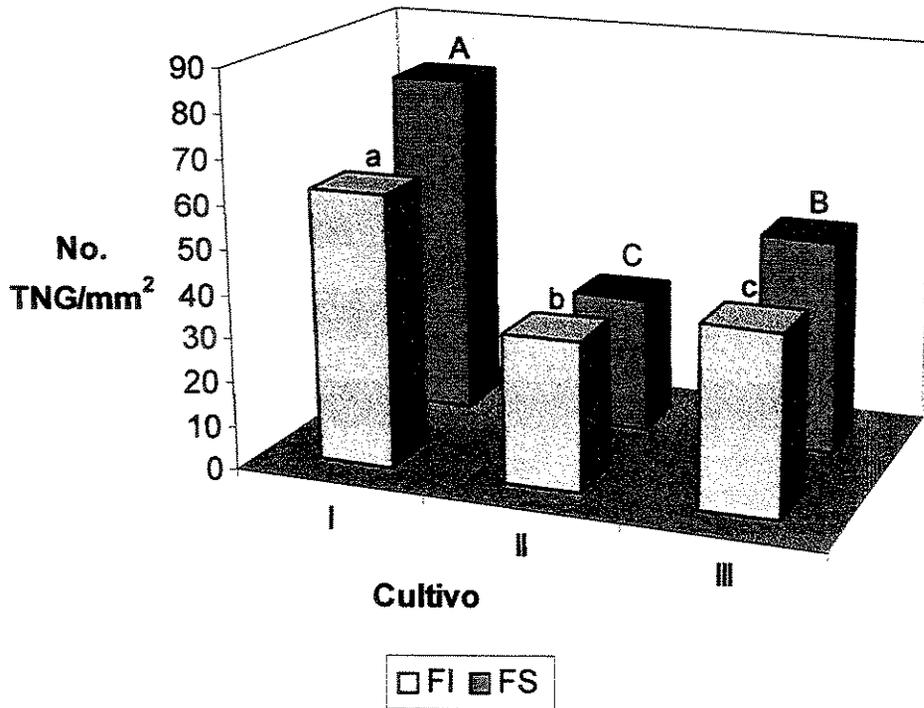
A substituição da vedação de PVC por tampão de algodão, nas plantas cultivadas em fotoperíodo de 16 horas e em luz contínua, resultou em valores menores no número de TG em ambas as faces, mas que não diferiram significativamente (fig. 5).

O efeito da adição de duas concentrações de ácido giberélico ( $GA_3$ ) ao meio de cultivo é mostrada na fig. 6. A adição de  $GA_3$  diminuiu significativamente a densidade dos TG (Tuckey 5%) apenas na face inferior. Já na face superior, este fitohormônio não alterou o número de TG.

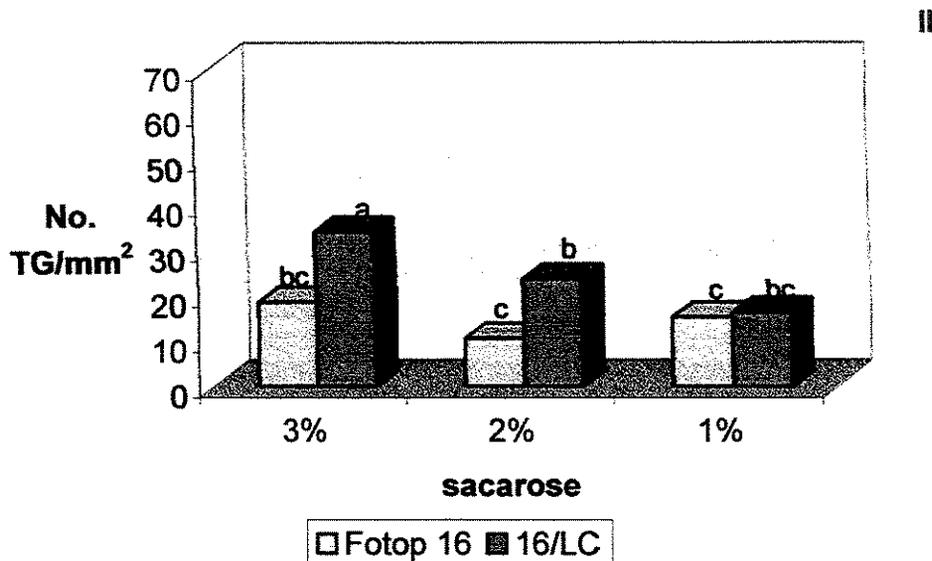
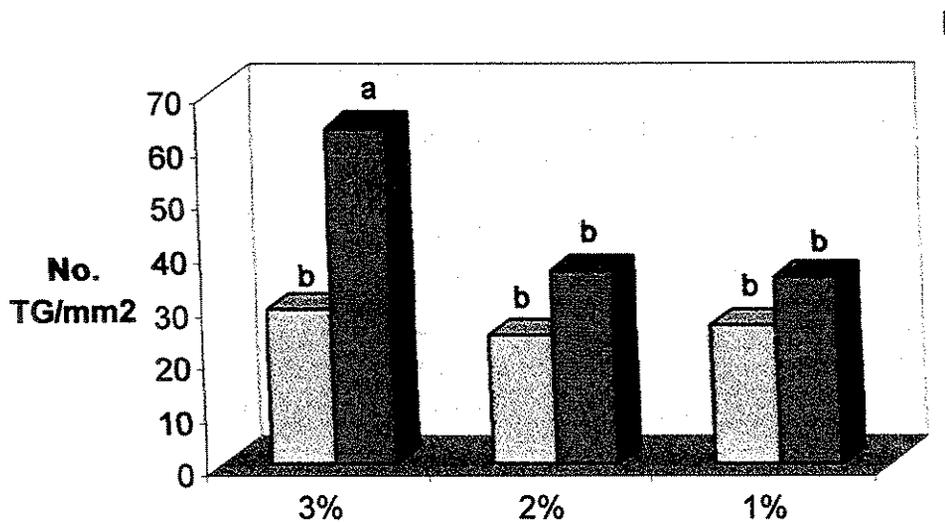
Na fig. 7, retomamos a comparação da densidade dos TG, entre a planta matriz (cultivada em casa de vegetação), o clone aclimatado, e o clone cultivado *in vitro*, agora nas condições que otimizaram a produção de TG, ou seja, 3% de sacarose e um período de luz contínua. Nesta nova comparação, verificamos que a densidade dos TG, no clone cultivado *in vitro* ainda é menor, na face inferior. No entanto, considerando a face superior, o número de TG não diferiu significativamente do clone aclimatado.



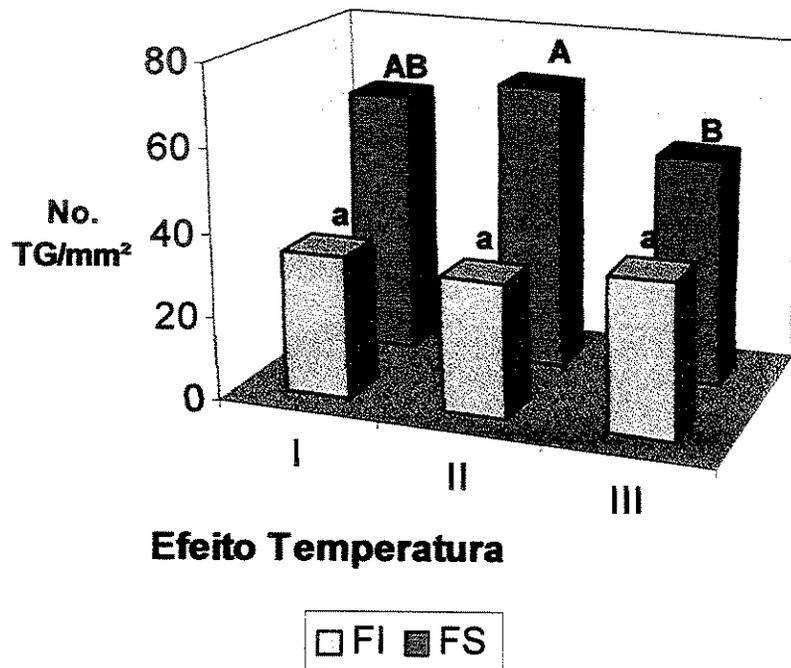
**Figura 1.** Comparação da densidade de tricomas glandulares da epiderme da face superior (FS) e inferior (FI) da folha de *B. tridentata*. **I:** Planta matriz cultivada em casa de vegetação com 18 meses de idade; **II:** clone cultivado *in vitro*, em meio MS básico, Fotoperíodo 16 horas, 25-27 °C, durante 31 dias; **III:** Clone aclimatado, com 6 meses de cultivo *ex-vitro*; Letras distintas indicam diferenças significativas. Letras maiúsculas comparam valores da face superior (cv: 13,2%; Tuckey 0,1%; P< 0,001) e letras minúsculas comparam valores da face inferior (cv: 11,2%; Tuckey 0,1%; P<0,001).



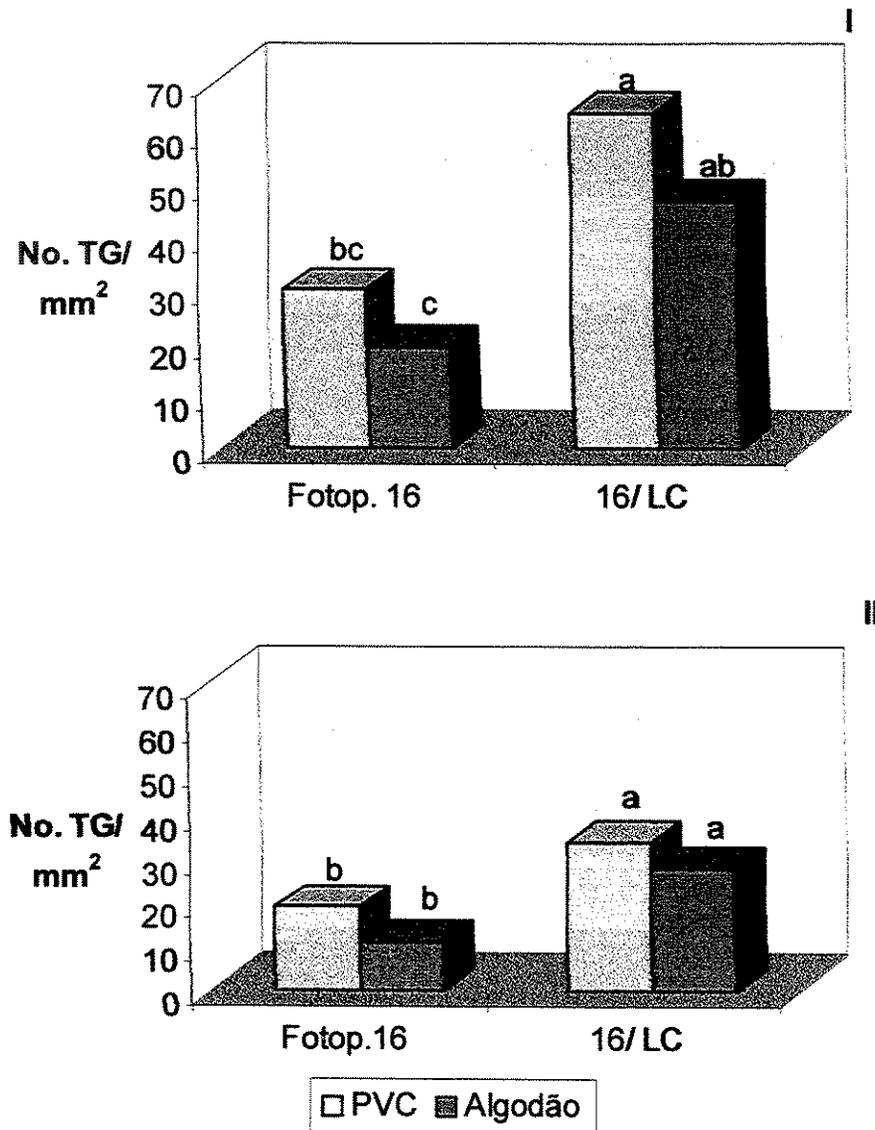
**Figura 2.** Comparação da densidade dos tricomas não glandulares (TNG)/mm<sup>2</sup> da epiderme da face superior (FS) e inferior (FI) da folha de *B. tridentata*. **I:** Planta matriz cultivada em casa de vegetação, com 18 meses de idade; **II:** clone cultivado *in vitro* em meio MS básico, Fotoperíodo 16 horas, 25-27°C, durante 31 dias; **III:** Clone aclimatado, com 6 meses de cultivo *ex-vitro*; Letras distintas indicam diferenças significativas. Letras maiúsculas comparam valores da face superior (cv: 8,8%; Tuckey 0,1%; P< 0,001) e letras minúsculas comparam valores da face inferior (cv: 11,8%; Tuckey 0,1%; P<0,001).



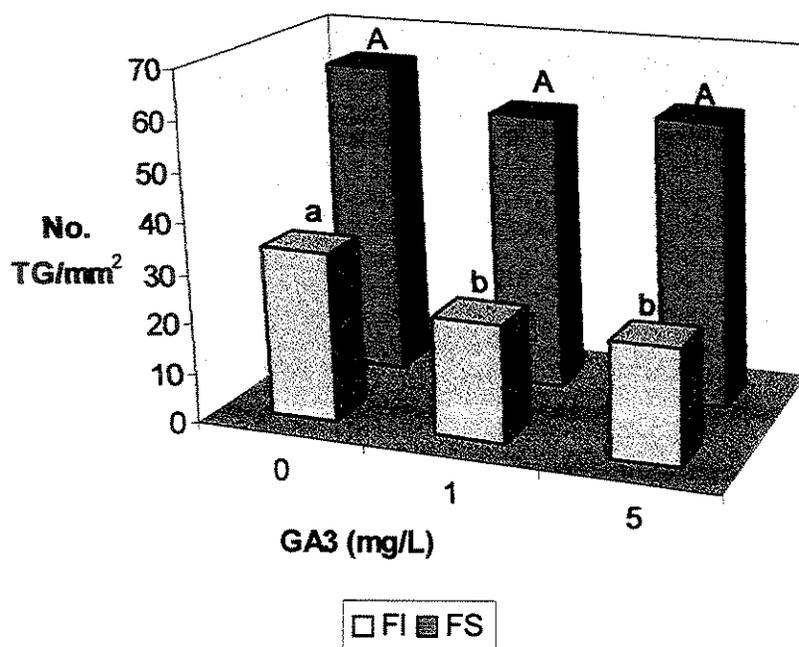
**Figura 3.** Efeito da interação de diferentes concentrações de sacarose (3%, 2% e 1%) e fotoperíodo (Fotop. 16 horas, Fotop. 16 horas/luz contínua) na densidade dos tricomas glandulares em plantas de *B. tridentada* cultivados *in vitro*, durante 31 dias. I: avaliação na face superior da folha (cv: 16,1%); II: face inferior da folha (cv:14,8%). Letras distintas representam diferenças significativas (Tuckey 0,1%;  $P < 0,001$ ). Os resultados constituem média de 3 repetições.



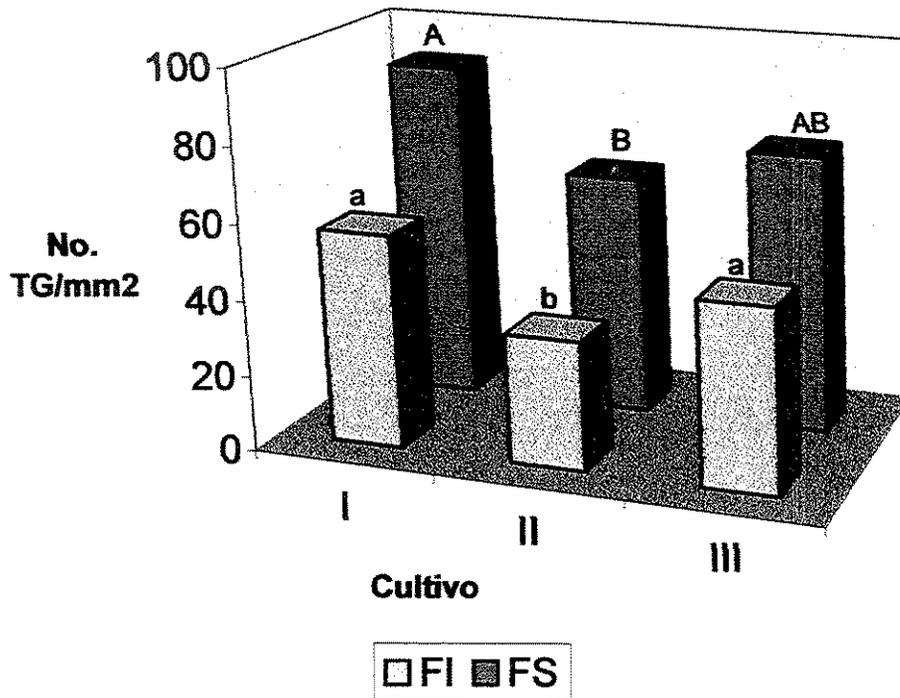
**Figura 4.** Efeito do abaixamento da temperatura na densidade dos tricomas glandulares (TG) da face superior e inferior da folha de *B. tridentata*, cultivada *in vitro* durante 31 dias, em meio MS, com 3% de sacarose, em fotoperíodo de 16 horas/Luz contínua, T: 25-27°C (I); e cultivada nas mesmas condições e submetida no 14º dia do cultivo, à temperatura de 6-8°C, durante 1 hora (II), e durante 24 horas (III). Os resultados representam médias de 3 repetições. Letras distintas representam diferenças significativas (Tuckey 5%;  $P < 0,1$ ). Letras minúsculas comparam valores da face inferior (cv: 8,4%) e letras maiúsculas valores da face superior (cv: 10,2%).



**Figura 5.** Efeito do tipo de vedação na densidade dos tricomas glandulares (TG) da epiderme de folhas de *B. tridentata*, após 31 dias de cultivo *in vitro*, sob fotoperíodo 16 h e fotoperíodo 16 h/ Luz contínua. Os resultados representam médias de 3 repetições. Letras distintas representam diferenças significativas. **(I)**: Face superior (cv: 17,7%, Tuckey 0,1%,  $P < 0,001$ ); **(II)**: Face inferior (cv: 15,0%, Tuckey 0,1%,  $P < 0,001$ ).



**Figura 6.** Efeito da adição de GA<sub>3</sub> ao meio de cultivo de plantas de *B. tridentata* na densidade dos tricomas glandulares. Avaliação na face superior (FS) e inferior (FI) das folhas, após 31 dias de cultivo *in vitro*, Fotop. 16/Luz Contínua; T: 25-27°C. Foram testadas duas concentrações de GA<sub>3</sub>: 1mg/L e 5mg/L no meio de cultivo. O controle foi constituído pelo meio sem adição de GA<sub>3</sub>. Os resultados representam médias de 3 repetições. Letras distintas representam diferenças significativas (Tuckey 5%, P < 0,05). Letras minúsculas comparam valores da epiderme inferior (cv: 13,6%) e letras maiúsculas valores da epiderme superior (cv: 11,1%).



**Figura 7.** Comparação da densidade dos tricomas glandulares da face superior (FS) e inferior (FI) da folha de *B. tridentata*, após otimização do cultivo *in vitro*. **I:** Planta matriz cultivada em casa de vegetação, com 18 meses de idade; **II:** clone cultivado em meio MS básico, 3% de sacarose, Fotoperíodo 16 h/ Luz Contínua, 25-27°C, durante 31 dias; **III:** Clone aclimatado, com 6 meses de cultivo *ex-vitro*; Letras distintas indicam diferenças significativas. Letras maiúsculas comparam valores da epiderme superior (cv: 11,5%; Tuckey 5%; P< 0,05) e letras minúsculas comparam valores da epiderme inferior (cv: 10,3%; Tuckey 1%; P<0,01).

## 5. DISCUSSÃO

Os agregados de tricomas apresentaram diferentes números de TG nos três tipos de cultivo, sendo menor no clone cultivado *in vitro*, sugerindo a influência das condições de crescimento da planta no desenvolvimento dos tricomas. Castro (1987) constatou em plantas de *B. tridentata* desenvolvidas no cerrado, que os TG são bisseriados, com cinco pares de células, e encontram-se agrupados em depressões da epiderme, em grupos de 3 a 4. Alguns autores (Larkin *et al.*, 1994; Hülskamp *et al.*, 1994), trabalhando com a espécie *Arabidopsis*, verificaram que o gene TTG desempenha papel em prevenir células adjacentes da epiderme de desenvolver tricomas, provavelmente através do controle da formação de um inibidor. Eles sugeriram que uma possível redução do nível funcional deste gene poderia resultar em grupos maiores de tricomas.

Embora a grande maioria dos estudos genéticos sobre o desenvolvimento dos tricomas tenha sido realizada na espécie *Arabidopsis*, que apresenta apenas tricomas não glandulares, a possibilidade do desenvolvimento inicial comum dos dois tipos de tricomas foi relatada para algumas espécies de Lamiaceae. Segundo Fahn (1986), vários autores têm sugerido que os TG de algumas espécies desenvolvem filogeneticamente dos TNG.

A elucidação dos genes envolvidos no desenvolvimento dos tricomas de *Arabidopsis* tem estimulado o desenvolvimento de estratégias, visando aumentar a produção de compostos secundários valiosos acumulados nos TG, através do aumento destas estruturas na planta (McCaskill & Croteau, 1999; Duke *et al.* 2000; Veronese *et al.* 2001).

As condições de cultivo do material botânico estudado neste presente trabalho diferem em vários aspectos. *In vitro* o crescimento das plantas é quase totalmente heterotrófico, sustentado pela adição de fonte de carboidrato ao meio de cultura. Embora as plantas cultivadas nestas condições tenham capacidade de realizar fotossíntese, elas o fazem

muito pouco, principalmente devido às condições inadequadas de iluminação e concentração de CO<sub>2</sub> (Kozai *et al*, 1995; Caldas *et al*, 1998). Provavelmente, as características do metabolismo primário, específicas do cultivo *in vitro*, influenciaram a alocação dos recursos da planta para as diversas necessidades de seu crescimento vegetativo, resultando na diminuição do número de TG/mm<sup>2</sup> verificada no clone micropropagado, em relação ao cultivo em casa de vegetação, tanto da planta matriz quanto clone aclimatado. Os valores menores de TG em clones cultivados *in vitro*, sugerem que as condições deste cultivo diminuem a expressão dos genes envolvidos na formação dos TG. No entanto esta expressão é prontamente restabelecida no clone aclimatado, apresentando estes, valores de TG/mm<sup>2</sup> que não diferiram significativamente da planta matriz, confirmando a micropropagação como uma ferramenta útil na propagação de genótipos valiosos. Provavelmente a escolha do tipo de explante utilizado foi determinante, pois segundo Murashige (1974), a propagação via ápices caulinares produz plantas idênticas à planta-mãe, pois os tecidos organizados do meristema apresentam maior estabilidade cromossômica.

Com relação aos tratamentos realizados, os resultados demonstraram que a densidade dos TG sofreu variação altamente significativa (P<0,001) com relação à face da folha, concentração de sacarose e regime de luz do cultivo *in vitro* das plantas de um clone de *B. tridentata*. As diferenças significativas do número de TG nas duas faces da epiderme evidenciam diferenças fisiológicas além de sensibilidades específicas aos fatores que estimulam a produção de tricomas. O efeito positivo do período de luz contínua na densidade dos tricomas tem sido relatado por Chien & Sussex (1996), que concluíram que a LC aumenta a sensibilidade dos tecidos à ação das giberelinas. Este fitohormônio tem sido relacionado com o desenvolvimento dos tricomas, regulando positivamente a expressão do gene GL1, em *Arabidopsis* (Chien & Sussex, 1996; Perazza *et al.*, 1998).

A interação entre a concentração de sacarose e o regime de luz, observada neste experimento, parece sugerir um envolvimento da fotossíntese e/ou do metabolismo dos carboidratos no desenvolvimento dos tricomas. Alguns estudos têm demonstrado que a diminuição da concentração da sacarose no meio de cultivo estimula a biossíntese de clorofila e aumenta a eficiência fotossintética das culturas *in vitro* (Edelman & Hanson, 1972; Capellades *et al*, 1991; Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997).

Nossos resultados mostrando o efeito positivo da luz contínua, nas duas faces (3% de sacarose) e na face inferior (2% de sacarose), sugerem que outros fatores, além do GA<sub>3</sub> poderiam estar envolvidos no desenvolvimento dos tricomas. Um possível aumento da atividade fotossintética e/ou alteração no metabolismo primário da planta, devido à diminuição da concentração da fonte de energia, pode ter influenciado o desenvolvimento dos tricomas.

Segundo Herms & Mattson, 1992, quando as condições ambientais são favoráveis, com abundância de recursos, o crescimento vegetativo geralmente recebe preferencialmente os recursos, diminuindo a disponibilidade relativa de Carbono para suportar estratégias de defesa, por exemplo, a produção de compostos secundários. Desta forma, estresses moderados, podem limitar o crescimento vegetativo, determinando novas direções para a alocação de recursos.

O abaixamento da temperatura constitui um estresse moderado, e poderia constituir um estímulo para uma maior produção dos tricomas glandulares. No entanto, os experimentos realizados mostraram que não houve alteração do número de TG na face inferior, e uma diminuição significativa da densidade dos TG, na face superior, nas plantas submetidas ao abaixamento da temperatura durante 24 horas. Além disso, sabe-se que a exposição a baixas temperaturas induzindo germinação e floração (vernalização) são processos nos quais as giberelinas tem sido implicadas. O conteúdo de GA, incluindo GA<sub>1</sub> e GA<sub>3</sub>, é alterado após a vernalização de *Brassica napus*, aumentando durante o período de baixa temperatura. Embora o mecanismo para termo indução da biossíntese de GA não seja

conhecido, tem sido sugerido que tratamento de baixas temperaturas podem estimular este processo (Hedden & Kamiya, 1997). Provavelmente, os resultados obtidos no presente experimento foram decorrentes de uma exposição ao tratamento, por um período de tempo insuficiente e/ou em uma fase não adequada do crescimento da planta.

Quanto a alteração da vedação, sabe-se que o microambiente do cultivo *in vitro*, caracteriza-se pela alta umidade e trocas gasosas restritas, que resultam em baixa concentração de CO<sub>2</sub> e alta concentração de etileno. O tampão de algodão altera estas características na medida em que permite trocas gasosas em maior grau e a diminuição da umidade no interior do frasco de cultivo. Uma das funções atribuídas aos tricomas relaciona-se à possibilidade deles criarem uma atmosfera próxima da epiderme, diminuindo a perda de água em ambientes com umidade relativa baixa. Desta forma, um ambiente *in vitro*, menos úmido, favorecido pelo tampão de algodão, poderia estimular o desenvolvimento dos tricomas nas folhas dos clones submetidos a este tratamento. Todavia, os resultados não permitiram confirmar esta hipótese no período de cultivo experimentado.

A adição de GA<sub>3</sub> ao meio de cultivo resultou em diminuição do número de tricomas apenas na face inferior, enquanto que alteração significativa não foi constatada na face superior. Estes resultados sugerem que deve existir uma concentração ótima deste fitohormônio e que o excesso pode ter efeito negativo. Este mecanismo de regulação por “feedback” foi relatado por Hedden & Kamiya (1997), segundo o qual, a ação de GA<sub>3</sub> resulta na produção de um fator repressor que limita a expressão de enzimas da sua biossíntese. Outros autores têm confirmado a regulação da biossíntese de GA<sub>3</sub> por feedback negativo (Ross *et al.*, 1999).

Após a otimização das condições *in vitro*, observamos que a densidade dos TG produzidos pelo clone micropropagado aumentou, mas é ainda significativamente menor do que a planta matriz. No entanto, considerando a face superior das folhas, a produção de TG no

cultivo *in vitro* não diferiu da condição do clone aclimatado. O possível efeito do tempo de cultivo da planta matriz e do clone aclimatado na densidade dos TG deve ser considerado e experimentos adicionais poderiam ser realizados, aumentando o tempo de exposição aos tratamentos realizados *in vitro*. Novos experimentos para identificação de períodos específicos do crescimento da planta, mais eficazes, para a exposição à luz contínua e ao abaixamento da temperatura, poderiam ser estabelecidos, visando melhorar os resultados obtidos com o clone cultivado *in vitro*.

## 6. CONCLUSÕES

. As condições do cultivo *in vitro* resultaram em plantas com menor densidade de tricomas glandulares foliares quando comparadas com as condições do cultivo em casa de vegetação. A manipulação do fotoperíodo com fornecimento de Luz contínua aumentou o número de TG/mm<sup>2</sup> quando comparado com o controle *in vitro*, sugerindo que existe uma plasticidade no desenvolvimento dos tricomas que pode ser explorada.

. O clone aclimatado apresentou densidade de TG que não diferiram significativamente da planta matriz cultivada em casa de vegetação, confirmando, neste aspecto, que a micropropagação via ápices caulinares produz plantas semelhantes à planta-mãe.

. Os resultados obtidos *in vitro* neste trabalho abrem várias possibilidades para o estudo da influência de outros fatores no desenvolvimento dos tricomas glandulares, visando a maior compreensão dos aspectos fisiológicos relacionados com a diferenciação destas estruturas. Por outro lado, estes resultados permitem também uma abordagem tecnológica sobre o potencial dos tricomas glandulares na produção de compostos secundários úteis através das culturas de partes aéreas (“shoot cultures”). Neste caso, o controle das condições de cultivo e a enorme possibilidade de manipulação, aliado ao tempo de cultivo, poderia resultar em uma relação custo/benefício favorável à produção de compostos secundários *in vitro*.



## CONCLUSÕES GERAIS

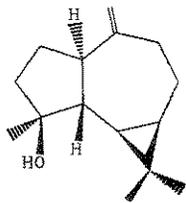
A micropropagação de plantas tem se mostrado muito útil na propagação de espécies de alto valor comercial e também em plantas com potencial terapêutico como é o caso de *B. tridentata*. Foi constatado que através desta técnica é possível obter plantas bastante homogêneas, o que foi corroborado pelo baixo coeficiente de variação verificado em todos os experimentos. Os estudos fisiológicos permitiram verificar que o metabolismo desta espécie resultou em acidificação do meio de cultivo, sugerindo que a mesma pode apresentar estratégias de adaptação a esta condição. Além disso, permitiram constatar que a diminuição da concentração de magnésio no meio de cultura estimula o desenvolvimento das raízes em um clone de *B. tridentata*, característica esta

que poderá ser utilizada no melhoramento do sucesso na aclimatação.

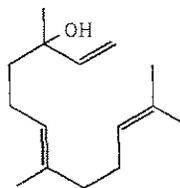
Através dos estudos anatômicos e histoquímicos, verificou-se que o cultivo *in vitro* inibiu o desenvolvimento de estruturas secretoras internas, como os ductos. Já os tricomas glandulares se apresentaram morfológicamente idênticos aos das plantas cultivadas em casa de vegetação evidenciando a competência das plantas *in vitro* em produzir compostos nestas estruturas. Um efeito marcante observado nas plantas cultivadas *in vitro* foi decorrente do tratamento em que se utilizou o tampão de algodão como vedação. O mesofilo mostrou-se mais diferenciado e aparentemente com maior número de cloroplastos. Os tricomas apresentaram-se mais diferenciados, grande parte deles em fase secretora.

Quanto à densidade dos tricomas foliares, os resultados mostraram interação altamente significativa do fotoperíodo e concentração de sacarose. Luz contínua e 3% de sacarose resultaram em maior número de tricomas glandulares. O número de tricomas é significativamente diferente nas duas epidermes da folha, sendo maior na superior. Também foi constatada resposta diferenciada das duas epidermes aos fatores estudados.

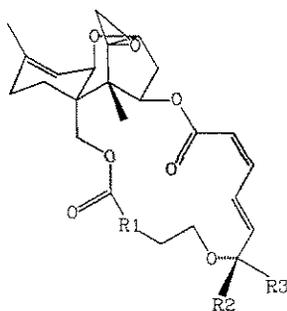
A investigação dos efeitos dos fatores ambientais, nutricionais e hormonais na diferenciação e densidade dos tricomas, permitiu concluir que através do monitoramento das condições de cultivo é possível melhorar as características das plantas cultivadas *in vitro*, tornando-as mais semelhantes às plantas cultivadas em condições naturais. Tais resultados poderão ser utilizados para aumentar as taxas de sobrevivência durante aclimação, e como parte de estratégias para favorecer a produção de compostos secundários pelas culturas de partes aéreas.



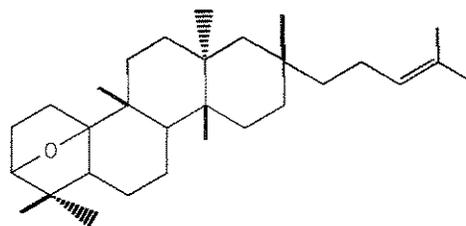
Epatulenol



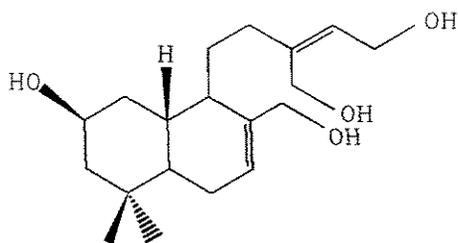
Nerolidol



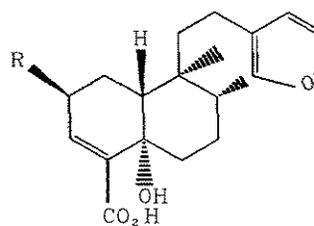
Macrocíclicos tricotecenos



*Baccharis* óxido



Labdanos



Clerodanos

**Anexo 1.** Compostos químicos presentes no gênero *Baccharis*.

	Concentrações dos componentes					
	Meio White		Meio MS		Meio B5	
	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L
<b>Macronutrientes</b>						
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	300	1,27	-	-	-	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	-	1650	20,6	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	134	1,01
KNO <sub>3</sub>	80	0,79	1900	18,8	2500	24,7
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	-	-	440	3,0	150	1,02
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	720	2,92	370	1,5	250	1,01
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	170	1,25	-	-
KCl	65	0,87	-	-	-	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200	1,41	-	-	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	16,5	0,12	-	-	150	1,05
<b>Micronutrientes</b>						
MnSO <sub>4</sub> .4 H <sub>2</sub> O	5,3	0,031	22,3	0,100	-	-
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	10	0,06
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	3,0	0,010	8,6	0,030	2,0	0,007
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5	0,024	6,2	0,100	3,0	0,048
KI	0,75	0,0045	0,83	0,005	0,75	0,0045
MoO <sub>3</sub>	0,01	0,000007	-	-	-	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	-	-	0,25	0,001	0,25	0,001
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0,010	0,0004	0,025	0,0001	0,025	0,0001
CoCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	-	-	0,025	0,0001	0,025	0,0001
<b>FeEDTA</b>						
Na <sub>2</sub> EDTA.2 H <sub>2</sub> O	-	-	37,3	0,100	*	0,050
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	-	-	27,8	0,100	*	0,050
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	2,5	0,0062	-	-	-	-
<b>Vitaminas e aminoácidos</b>						
Ácido nicotínico	0,5	0,004	0,5	0,004	1,0	0,008
Piridoxina.HCl	0,1	0,05	0,5	0,0024	1,0	0,005
Tiamina.HCl	0,1	0,0003	0,1	0,0003	10	0,030
Glicina	3,0	0,04	2,0	0,027	-	-
Mio-inositol	-	-	100	0,55	100	0,55

Fonte: Caldas *et al.* (1998)

**Anexo 2.** Composição dos meios White, MS e B5. MS: Murashige & Skoog (1962), B5: Gamborg *et al.* (1968), White: White (1943), acrescida de Cu e Mo.

## BIBLIOGRAFIA CITADA

- Alfermann, A.W. & Petersen, M., 1995. Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 43: 199-205.
- Almeida, V.P.& Shepherd, S.K.L., 1999. *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae): *in vitro* cultivation of a native plant of the Brazilian cerrado. *Revta. Brasil. Bot.* 22 (3):381-384.
- Aloni, R., 1987. Differentiation of vascular tissues. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 179-204.
- Ascensão, L. Pais, S.S., 1987. Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. Maritima): Ontogeny and histochemistry of the secretory product. *Bot.Gaz.* 148(2):221-227.
- Ascensão , L.; Marques, N. & Pais, M.S., 1997. Peltate glandular trichomes of *Leonotis leonurus* leaves: ultrastructure and histochemical characterization of secretions. *Int. J. Plant Sci.* 158 (3): 249-258.
- Balandrin, M.F., Klocke, J.A., Wurtele, E.S., Bollinger, W.H., 1985. Natural plant Chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228:1154-1159.
- Barroso, G.M., 1976. Compositae – subtribo Baccharidinae Hoffmann. Estudo das espécie ocorrentes no Brasil. *Rodriguesia*, 28: 3-273.
- Barroso, G.B., 1986. Sistemática de angiospermas do Brasil. V.3, Ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, pp.272-274.
- Bhojwani, S.S. & Razdan, M.K., 1983. *Plant Tissue Culture: Theory and practice. Clonal Propagation* .Cap.15, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp.313-337.
- Biasi, R. & Altamura, M.M., 1996. Light enhances differentiation of the vascular system in the fruit of *Actinidia deliciosa*. *Physiol. Plant.* 98: 28-35.

- Bohlmann, F., Banerjee, S., Jakupovic, J., Grenz, M., Misra, L.N., Schmeda-Hirschmann, G., King, R.M. & Robinson, H., 1985. Clerodane and labdane diterpenoids from *Baccharis* species. *Phytochemistry* 24(3):511-515.
- Bosabalidis, A.M. & Exarchou, F. 1995. Effect of NAA and GA<sub>3</sub> on leaves and glandular trichomes of *Origanum x Intercedens* Rech.: Morphological and anatomical features. *Int. J. Plant Sci.* 156(4):488-495.
- Bourett, T.M., Howard, R.J., O'Keefe, D.P. & Hallahan, D.L., 1994. Gland Development on leaf surfaces of *Nepeta racemosa*. *Int. J. Plant Sci.* 155(6): 623-632.
- Caldas, L.S., Harisadan, P., Ferreira, M.E. 1998. Meios nutritivos. In: *Cultura de Tecidos e Transformação genética de plantas* (A.C. Torres, L.S. Caldas, J.A. Buso, eds), ABCTP/EMBRAPA-CNPH, Brasília, p. 87-132.
- Camerik, A.M. & Werger, M.J.A., 1981. Leaf characteristics of the flora of the high plateau of Itatiaia, Brasil. *Biotropica* 13(1): 39-48.
- Capellades, M., Lemeur, R., Debergh, P. 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured in vitro. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 25:21-26.
- Carpita, N.C. & McCann, M. 2000. The cell wall. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* ( Buchanan, B, Gurissen, W. & Jones, R. eds), American Society of Plant Physiologists, Maryland, USA. pp. 52-108.
- Castro, M.M., 1987. Estruturas secretoras em folhas de espécies da família *Asteraceae*: Aspectos estruturais e histoquímicos. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, tese de Doutorado.
- Castro, M.M., Leitão Filho, H.F. & Monteiro, W.R. 1997. Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de *Asteraceae* de uma vegetação de cerrado. *Revta. Brasil. Bot.* 20(2):163-174.

- Chien, J.C. & Sussex, M. 1996. Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberelins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana*(L.) Heynh. *Plant Physiol.* 111:1321-1328.
- Chung, C.-T.A. & Staba, E.J., 1988. Effect of precursors on growth and alkaloid production in *Cinchona ledgeriana* leaf-shoot organ cultures. *Planta med.* 54: 206-210.
- Cobos, M.I., Rodriguez, J.L., Oliva, M.M., Demo, M., Faillaci, S.M. & Zygadlo, J.A.,2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Baccharis notoserigila*. *Planta med.* 67: 84-86.
- Constabel, F., Gaudet-La-Prairie, P., Kurz, W.W. & Kutney, J.P., 1982. Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures. *Plant cell Rep.* 1; 139-142.
- Cortelazzo, A.L. 1992. Detecção e quantificação de amido em cotilédones de *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata* durante o desenvolvimento inicial da planta. *Revta. Bras. Bot.* 15(2): 157-162.
- Croes, A.F.; Van den Berg, A.J.R.; Bosveld, M.; Breteler, H.; Wullem, G.J.1989. Thiophene accumulation in relation to morphology in roots of *Tagetes patula*. *Planta* 179: 43-50.
- Cutter, E.G., 1978. *Plant Anatomy. Part I. Cells and Tissues.* Edward Arnold, London, pp.8-21.
- De Silva, D.L.R.; Hetherington, A.M. & Mansfield, T.A. 1996. Where does all the calcium go? Evidence of an important regulatory role for trichomes in two calcicoles. *Plant, Cell and Environment* 19: 880-886.
- Dimassi-Theriou, K.& Bosabalidis, M. 1997. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in kiwifruit cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 47:127-134.
- Duke, S.O. & Paul, R.N. 1993. Development and fine structure of the glandular trichomes of *Artemisia annua* L. *Int. J. Plant Sci.* 154: 107-118.

- Duke, M.V., Paul, R.N., Elsohly, H.N., Sturtz, G. & Duke., S.O., 1994. Localization of artemisinin and artmisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua*. *Int. J. Plant Sci.* 155(3): 365-372.
- Duke, S.O., Canel, C., Rimando, A.M., Tellez, M.R., Duke, M.V., Paul, R.N. 2000. Current and potential exploitation of plant glandular trichome productivity. *Adv. Bot. Res.* 31:121-151.
- Edelman, J & Hanson, A.D. 1972. Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot tissue cultures. *J. Exp. Bot.* 23(75):469-478.
- Endress, R. 1994. Plant cells as producers of secondary compounds. In: *Plant Cell Biotechnology* (Endress, R. eds), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 121-255.
- Esau, K. 1974. *Anatomia das plantas com sementes*. Ed. Edgard Blücher LTDA. São Paulo.
- Fahn, A., 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol.* 108: 229-257.
- Fahn, A. 2000. Structure and function of secretory cells. *Adv. Bot. Res.* 31: 37-75.
- Ferracini, V., Silva, A.G., Paraiba, L.C., Leitão Filho, H.F., Marsaioli, A.J. 1996. Essential oils of seven brazilian *Baccharis*: a prospective approach on their ecological role. *Proc. Int. Comp. Conf., Kew.* 2:467-474.
- Ferreira, J.F.S.; Simon, J. E. & Janick, J. 1995. Relationship of artemisinin content of tissue cultured greenhouse grown, and field grown plants of *Artemisia annua*. *Planta Med.* 61:351-355.
- Ferreira, J.F.S. & Janick, J., 1996. Roots as an enhancing factor for the production of artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 44:211-217.

- Ferreira, M.E.; Caldas, L.S. & Pereira, E.A., 1998. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. Cultura de Tecidos e Transformação de Genética de Plantas. Vol.I – Embrapa; Brasília – DF.
- Fowler, M.W., 1985. Plant Cell Culture – Future Perspectives. In: Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures (Neumann, K.H., Barz, W. & Reinhard, E., eds), Springer-Verlag, Berlin, pp. 362-370.
- França, S.C., 1999. Abordagens biotecnológicas para obtenção de substâncias ativas. In: Farmacognosia – da planta ao medicamento (C.M.O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A.Mentz, P.R.Petrovick eds.), Editora da UFSC/ Ed. UFRS. pp. 101-121.
- Franceschi, V.R. & Horner, H.T., 1980. Calcium oxalate crystals in plants. Bot. Rev. 46: 361-427.
- Gahan, P.B., 1984. Plant histochemistry and cytochemistry. Academic Press, London.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. & Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50:151-158.
- Gené, R.M., Cartañá, C., Adzet, T., Marín, E., Parella, T. & Cañigüeral, S., 1996. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. Planta med. 62: 232-235.
- Gershenzon, J., Maffei, M. & Croteau, R., 1989. Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). Plant Physiol. 89: 1351-1357.
- Gigon, A. & Rorison, I.H., 1972. Response of some ecologically distinct plant species to nitrate and to ammonium nitrogen. J. Ecol. 60: 93- 102.

- Grattapaglia, D. & Machado, M.A., 1998. Micropropagação . In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. Cultura de Tecidos e Transformação de Genética de Plantas. Vol.I – Embrapa; Brasília – DF.
- Heble, M.R., 1985. Multiple shoot cultures: A viable alternative in vitro system for the production of known and new biologically active plant constituents. In: Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures (Neumann, K.H., Barz, W. & Reinhard, E., eds), Springer-Verlag, Berlin, pp. 281-289.
- Hedden, P. & Kamiya, Y. 1997. Gibberellin Biosynthesis: Enzymes, Genes and their regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:431-460.
- Heras, B.de las, Slowing, K., Benedi, J., Carretero, E., Ortega, T., Toledo, C., Bermejo, P., Iglesias, I., Abad, M.j., Gomez-Serranillos, P., Liso, P.A., Villar, A. & Chiriboga, X., 1998. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *J. Ethnopharmacol.* 61: 161-166.
- Herms, D.A. & Mattson, W.J., 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *The Q. Rev. Biol.* 67:283-335.
- Herz, W., 1977. Astereae-chemical review. In: *The Biology and Chemistry of the Compositae* ( Heywood, V.H., Harbone, J.B. & Turner, B.L. eds), Academic Press, London- New York, pp. 567- 576.
- Hildebrandt, V. & Harney, P.M., 1988. Factors affecting the release of phenolic exudate from explants of *Pelargonium X hortorum*, Bailey “Sprinter Scarlet”. *J. Hort. Sci.* 63 (4): 651-657.
- Hitmi, A., Barthomeuf, C. & Sallanon, H., 1999. Rapid mass propagation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. By callus culture and ability to synthesise pyrethrins. *Plant Cell Rep.* 19: 156-160.

- Hoagland, D.R. & Arnon, D.L., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Calif. Agric. Exp. Sta. Circ. 347.
- Hoehne, F.C., 1939. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. São Paulo. pp. 302-303.
- Hu, C.Y. & Wang, P.J., 1983. Meristem, Shoot Tip, and Bud Cultures. In: Handbook of Plant Cell Culture (Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. & Yamada, Y., eds), Vol. I, MacMillan Publ., New York, pp. 177-227.
- Hülkamp, M., Misera, S., Jürgens, G. 1994. Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. Cell, 76:555-566.
- Islam, A.K.M.S.; Edwards, D.G. & Asher, C.J., 1980. pH optima for crop growth . Plant and Soil 54: 339- 357.
- Jarvis, B.B. & Midiwo, J.O., 1988. The mystery of trichothecene antibiotics in *Baccharis* species. J. Nat. Prod. 51(4): 736-744.
- Jakupovic, J., Schuster, A., Ganzer, U., Bohlmann, F. & Boldt, P.E., 1990. Sesqui- and diterpenes from *Baccharis* species. Phytochemistry 29(7): 2217-2222.
- Johansen, D.A., 1940. Plant microtechnique. 1<sup>a</sup>. Ed., McGraw-Hill Book Company, New York, pp. 27-48.
- Johansson, M., Kronstedt-Robards, E.C. & Robards, A.W., 1992. Rose leaf structure in relation to different stages of Micropropagation. Protoplasma 166: 165-176.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. Journal of Cell Biology 27:137-138.
- Kavanagh, K., Drew, A.P. & Maynard, C., 1991. The effect of the culture vessel on micropropagation. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry (Bajaj, Y.P.S., ed), Vol.17, Springer-Verlag, Berlin, pp. 202-211.

- Kelsey, R.G., Reynolds, G.W. & Rodrigues, E., 1984. The Chemistry of Biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. In: Biology and Chemistry of Plant Trichomes (Rodrigues, E., Healey, P.L. & Mehta, I., eds), Plenum Press, New York, pp. 187- 241.
- Kirby, E.G., Leuster, T. & Lee, M.S. 1987. Nitrogen nutrition. In: Cell and Tissue Culture in forestry. Vol. I General principles and Biotechnology (Bonga, J.M. & Durzan D.J., eds), Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, pp. 67-88.
- Kozai, T., 1991. Acclimatization of micropropagated plants. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry (Bajaj, Y.P.S., ed), Vol.17, Springer-Verlag, Berlin, pp.127-141.
- Kozai, T., Fujiwara, K., Kitaya, Y. 1995. Modeling, measurement and control in plant tissue culture. Acta Hort. 393:63-73.
- Kubasek, W.L.; Ausubel, F.M. & Shirley, B.W., 1998. A light-independent developmental mechanism potentiates flavonoid gene expression in *Arabidopsis* seedlings. Plant Molecular Biology 37: 217- 223.
- Larkin, J.C., Oppenheimer, D.G., Lloyd, A.M., Papanozzi, E.T., Marks, M. D. 1994. Roles of the GLABROUS1 and TRANSPARENT TESTA GLABRA genes in *Arabidopsis* trichome development. The Plant Cell, 6:1065-1076.
- Lewis, O.A.M. & Chadwick, S., 1983. An N investigation into nitrogen assimilation in hydroponically grown barley (*Hordeum vulgare* L. CV Clipper) in response to nitrate, ammonium and mixed nitrate and ammonium nutrition. New Phytol. 95: 635- 646.
- Liersch, R., Soicke, H., Stehr, C., Tüllner, H.U. 1986. Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetation period. Planta Med. 387-390.
- Loayza, I., Abujder, D., Aranda, R., Jakupovic, J., Collin, G., Deslauriers, H. & Jean, F.- I., 1995. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. Phytochemistry 38(2): 381-389.

- Lopes, N.P., Kato, M.J., Andrade, E.H.A., Maia, J.G.S., Yoshida, M., Planchart, A.R. & Katzin, A.M., 1999. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiãpi Amazon Indians. *J. Ethnopharmacol.* 67: 313-319.
- Macedo, C.S., Uhrig, M.L., Kimura, E.A., Katzin, A.M. 2002. Characterization of the isoprenoid chain of coenzyme Q in *Plasmodium falciparum*. *FEMS Microb. Lett.* 207: 13-20
- Maia, V. 1979. Técnica histológica. Ed Atheneu. São Paulo.
- McCaskill, D. & Croteau, R. 1999. Strategies for bioengineering the development and metabolism of glandular tissues in plants. *Nature Biotechnology* 17:31-36.
- Maffei, M., Gallino, M. & Sacco, T., 1986. Glandular trichomes and essential oils of developing leaves in *Mentha viridis* lavanduliodora. *Planta medica* 52: 187-193.
- Maffei, M. & Sacco, T. 1987. Chemical and morphometrical comparison between peppermint notomorphs. *Planta Med.* 53: 214-216.
- Majada, J.P.; Tadeo, F.; Fal, M.A. & Sanchez-Tamés, R. 2000. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 63: 207-214.
- Marks, T.R. & Simpson, S.E., 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. *J. Hort. Sci.* 65(2): 103-111.
- Marques, D.A.; Shepherd, S.L.K. & Crocomo, O.J., 1998. Influência de fontes de nitrogênio sobre o desenvolvimento das gemas axilares de explantes culinares de *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cultivado *in vitro*. *Revta. Bras. Bot.* 21(2): 141- 147.
- Martinelli, G.; Bandeira, J. & Bragança, J.O., 1996. Campos de altitude. Rio de Janeiro: Editora Index, p.102-133.
- McGarvey, D.J. & Croteau, R., 1995. Terpenoid Metabolism. *The Plant Cell* 7: 1015-1026.

- Mello, M.L.S. & Vidal, B.C., 1978. A reação de Feulgen. *Cienc. Cult.* 30: 665-676.
- Mongelli, E., Desmarchelier, C., Talou, J.R., Coussio, J. & Ciccía, G., 1997. In vitro antioxidant and citotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC. *J. Ethnopharmacol.* 58: 157-163.
- Monteiro, W.R., Giuliatti, A.M., Mazzoni, S.C. & Castro, M.de M., 1979. Hairs on reproductive organs of some Erioucalaceae and their taxonomic significance. *Bol. Botânica, Univ. S. Paulo* 7: 43-59.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A revised medium for Rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Murashige, T., 1974. Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.
- Nielsen, M.T.; Akers, C.P.; Järlfors, U.E.; Wagner, G.J. & Berger, S. 1991. Comparative ultrastructural features of secreting and nonsecreting glandular trichomes of two genotypes of *Nicotiana tabacum* L. *Bot. Gaz.* 152(1): 13-22.
- Perazza, D., Vachon, G., Herzog, M. 1998. Gibberellins promote trichome formation by up-regulating GLABROUS1 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 117:375-383.
- Peterson, R.L. & Vermeer, J., 1984. Histochemistry of trichomes. In: *Biology and Chemistry of Plant Trichomes* (Rodrigues, E., Healey, P.L. & Mehta, I., eds), Plenum Press, New York, pp. 71-94.
- Queiroga, C.L., Fukai, A. & Marsaioli, A.J., 1990. Composition of the essential oil of vassoura. *J.Braz.Chem.Soc.*1(3): 105-109.
- Queiroga, C.L., Ferracini, V.L. & Marsaioli, A.J., 1996. Three new oxygenated cadinanes from *Baccharis* species. *Phytochemistry* 42(4): 1097-1103.
- Raab, T.K. & Terry, N., 1994. Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.* 105: 1159- 1166.

- Rahalison, L., Benathan, M., Monod, M., Frenk, E., Gupta, M.P., Solis, P.N., Fuzzati, N. & Hostettmann, K., 1995. Antifungal principles of *Baccharis pedunculata*. *Planta med.* 61: 360- 362.
- Rizzo, I., Varsavky, E., Haidukowski, M. & Frade, H., 1997. Macrocyclic trichothecenes in *Baccharis coridifolia* plants and endophytes and *Baccharis artemisioides* plants. *Toxicon.* 35(5): 753-757.
- Robins, R.J., 1994. Secondary products from cultured cells and organs: I. Molecular and cellular approaches. In: *Plant Cell Culture – A Practical Approach* (R.A. Dixon & R.A. Gonzales, Eds.), IRL Press, Oxford University Press, Oxford, pp. 169-197.
- Ross, J.J., Mackenzie-Hose, A.K., Davies, P.J., Lester, D.R., Twitchin, B., Reid, J.B. 1999. Further evidence for feedback regulation of gibberellin biosynthesis in pea. *Physiologia Plantarum* 105:532-538.
- Ruiz, L.P. & Mansfield, T.A. 1994. A postulated role for calcium oxalate in the regulation of calcium ions in the vicinity of stomatal guard cells. *New Phytol.* 127: 473-481.
- Ruiz, N.; Ward, D. & Saltz, D., 2002. Calcium oxalate crystals in leaves of *Pancratium sickenbergeri*: constitutive or induced defense? *Funct. Ecol.* 16: 99-105.
- Salsac, L.; Chaillou, S.; Morot-Gaudry, J.F.; Lesaint, C. & Jolivet, E., 1987. Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 25(6): 805- 812.
- Simões, C.M.O., Mentz, L.A., Schenkel, E.P., Irgand, B.E. & Stehmann, J.R., 1986. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. Ed. da UFRGS, Porto Alegre, pp. 42-45.
- Simões, C.M.O. & Spitzer, V. 1999. Óleos voláteis. In: *Farmacognosia-da planta ao medicamento* (C.M.O. Simões, E. P. Schenkel, G.Gosmann, J.C.P. Mello, L.A.Mentz, P.R.Petrovick eds.), Editora da UFSC/ Ed. UFRS. p.387-415.

- Silva, T.R.G. , Cortelazzo, A.L. & Dietrich, S.M.C., 1997. Cytological aspects of storage mobilization in seeds of *Dalbergia miscolobium* during germination and plantlet growth. *Cienc. Cult.*, 49(3): 219-222.
- Souza, M.P., Matos, M.E.O. & Matos, F.J.A., 1991. Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras. Fortaleza, pp. 223-228.
- Sudriá, C., Palazón, J., Cusidó, R., Bonfill, M., Piñol, M.T., Morales, C. 2001. Effect of benzyladenine and indolebutyric acid on ultrastructure, gland formation, and essential oil accumulation in *Lavandula dentata* plantlets. *Biol. Plant.* 44(1):1-6.
- Sutherland, J.M.; Andrews, M.; McInroy, S. & Sprent, J.I., 1985. The distribution of nitrate assimilation between root and shoot in *Vicia faba* L. *Ann. Bot.* 56: 259- 265.
- Tabata, M. 1977. Recent Advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures. In: *Proceedings in Life Sciences Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application* (W.Barz, E. Reinhard, M.H.Zenk eds.), Springer Verlag, Berlin.p.3-16.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 1991., *Plant Physiology* . The Benjamin/Cummings Publishing Company, California.
- Takács, E. & Técsi L., 1992. Effects of  $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$  ratio on photosynthetic rate, nitrate reductase activity and chloroplast ultrastructure in three cultivars of red Pepper (*Capsicum annum* L.). *J. Plant Physiol.* 140: 298- 305.
- Tolley-Henry, L. & Raper Jr., C.D., 1986. Utilization of ammonium as a nitrogen source. *Plant Physiol.* 82: 54- 60.
- Turner, J.C., Hemphill, J.K. & Mahlberg, P.G., 1980. Trichomes and cannabinoid content of developing leaves and bracts of *Cannabis sativa* L. (*Cannabaceae*). *Amer. J. Bot.* 67(10): 1397-1406.
- Uphof, J.C.Th. 1968. *Dictionary of economic plants*. 2a. ed. Verlag Von Cramer. Germany. p. 62.

- Veronese, P., Li, X., Niu, X., Weller, S.C., Bressan, R.A. & Hasegawa, P.M., 2001. Bioengineering mint crop improvement. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 64: 133-144.
- Vidal, B.C. 1970. Dichroism in collagen bundles stained with xyloidine Ponceau 2R. *Ann. Histochem.* 15: 289-296.
- Vidal, B.C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Mol. Biol.* 22: 45- 64.
- Wagner, G.J. 1991. Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiol.* 96:675-679.
- Wardle, K., Dobbs, E.B. & Short, K.C., 1983. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 108: 386-389.
- Werbrouck, S.P.O. & Debergh, P.C., 1994. Applied aspects of plant regeneration. In: *Plant Cell Culture – A Practical Approach* (R.A. Dixon & R.A. Gonzales, Eds.), IRL Press, Oxford University Press, Oxford, pp. 127-134.
- Werker, E. 2000. Trichome diversity and development. *Adv. Bot. Res.* 31:1-35.
- Wetzstein, H.Y. & Sommer, H.E. 1982. Leaf anatomy of tissue cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. *Amer. J. Bot.* 69(10): 1579-1586
- White, P.R., 1943. Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. *Am. J. Bot.* 30:33-36.
- Whitaker, R.J. & Hashimoto, T., 1986. Production of secondary metabolites, In: *Handbook of plant cell culture* (Evans, D.A., Sharp, W.R. & Ammirato, P.V., eds), Vol.4, MacMillan Publishing Company, New York, pp. 264-286.
- Woerdenbag, H.J.; Lüers, J.F.J.; Uden, W. van; Pras, N.; Malingré, T.M. & Alfermann, A.W. 1993. Production of the new antimalarial drug artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua* L. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 32: 247-257.

World Health Report, 1999. Rolling Back Malaria. World Health Organization, pp. 49-63.

Zunini, M.P., Newton, M.N., Maestri, D.M. & Zygadlo, J.A., 1998. Essential oils of three *Baccharis* species. *Planta med.* 64: 86, 87.