

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



MÁRCIA APARECIDA NOVAES GOMES

**CULTIVO *IN VITRO* DA ESPÉCIE DO CERRADO *Sinningia*  
*allagophylla* (Martius) Wiehler (GESNERIACEAE):  
ENRAIZAMENTO, TUBERIZAÇÃO E NUTRIÇÃO COM  
ÊNFASE EM ALUMÍNIO**

.....  
de e ampr. ....

.....  
.....

.....  
.....

.....  
.....

.....  
.....

.....  
.....

.....  
.....

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas para a  
obtenção do Título de Doutor em Biologia  
Vegetal.

**Orientadora: Profa. Dra. Simone L. Kirszenzaft Shepherd.**

2006

UNIDADE BC  
Nº CHAMADA \_\_\_\_\_  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BC/ 63208  
PROC 26/23/06  
C \_\_\_\_\_ D X  
PREÇO 11,00  
DATA 29/04/06  
Nº CPD \_\_\_\_\_

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

G585c

Gomes, Márcia Aparecida Novaes  
Cultivo *in vitro* da espécie do cerrado *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae): enraizamento, tuberização e nutrição com ênfase em alumínio / Márcia Aparecida Novaes Gomes. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

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

1. Cerrados. 2. Plantas – Propagação *in vitro*. 3. Tuberização. 4. Raízes (Botânica). I. Shepherd, Simone Liliane Kirszenzaft. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** *In vitro* cultivation of cerrado species *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae): rooting, tuberization and nutrition with emphasis in aluminium.

**Palavras-chave em inglês:** Cerrado; Plant micropropagation; Tuberization; Roots (Botany).

**Área de concentração:** Biologia Vegetal.

**Titulação:** Doutora em Biologia Vegetal.

**Banca examinadora:** Simone Liliane Kirszenzaft Shepherd, Suzelei de Castro França, Vilma Palazetti de Almeida, Lillian Beatriz Penteado Zaidan, Pedro Roberto Furlani.

**Data da defesa:** 09/02/2006.

Data de defesa: Campinas, 09 de fevereiro de 2006

**Banca examinadora:**

Profª. Dra. Simone Liliãne Kirszenzaft Shepherd

Simone de Luzgoff Shepherd

Profª. Dra. Suzelei de Castro França

Suzelei de Castro França

Profª. Dra. Vilma Palazetti de Almeida

Vilma Palazetti de Almeida

Profª. Dra. Lilian Beatriz Penteadó Zaidan

Lilian Beatriz Penteadó Zaidan

Prof. Dr. Pedro Roberto Furlani

Pedro Roberto Furlani

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Jorge Vega

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Giulio Cesare Stancato

\_\_\_\_\_

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Milton (*in memoriam*) e Irene, ao Arnaldo  
e Tadeu, com amor.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp, por ter possibilitado a realização do presente trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À Profa. Dra. Simone Liliane Kirszenzaft Shepherd, pela orientação, ensinamentos, contribuição na formação acadêmica e por todos esses anos de amizade.

Ao Prof. Dr. Pedro Roberto Furlani, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), pelo auxílio na elaboração do meio de cultivo e na interpretação dos resultados obtidos.

Ao Prof. Dr. Arício Xavier Linhares, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Unicamp, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Dra. Mônica Ferreira de Abreu, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), pela orientação e auxílio na realização das análises químicas.

Aos professores Dra. Lílian Beatriz Penteado Zaidan, Dra. Vilma Palazetti de Almeida e Dr. Pedro Roberto Furlani, pelas sugestões e críticas da pré-banca.

À bióloga Dulce Regina Garcia Joaquim, técnica do Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp, pelos ensinamentos, auxílios e pela amizade.

Aos técnicos do Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp Carlos Roberto Custódio de Almeida e Denise Cristina da Silva, pelos auxílios prestados e amizade.

Aos funcionários da Reserva Biológica de Moji Guaçu (SP), pelos auxílios prestados na coleta de material.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp, pela convivência e amizade.

Aos docentes e funcionários da Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp, pelos ensinamentos, auxílios e por todos esses anos de convivência.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Biologia Vegetal (Unicamp), pelos auxílios prestados.

Aos meus irmãos e cunhadas, minha mãe e minha tia Saturnina, pela contribuição na realização deste trabalho.

Ao Arnaldo e ao Tadeu, pelo companheirismo e paciência.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

Abreviaturas .....	ix
Lista de Figuras .....	x
Lista de Tabelas .....	xii
Resumo Geral .....	xiii
Summary .....	xvi
Introdução Geral .....	1
Objetivos Gerais .....	14
Capítulo I – Enraizamento <i>in vitro</i> e micropropagação de <i>Sinningia allagophylla</i> .....	15
Resumo .....	17
Introdução .....	18
Materiais e Métodos .....	22
1. Material vegetal .....	22
2. Desinfestação das sementes .....	22
3. Condições de cultivo .....	23
4. Propagação das microplantas .....	23
5. Enraizamento <i>ex vitro</i> .....	26
6. Enraizamento <i>in vitro</i> .....	26
6.1. Efeito da concentração de sacarose .....	27
6.2. Efeito da temperatura .....	27
7. Transplântio e aclimação .....	27

Resultados e Discussão .....	29
1. Germinação <i>in vitro</i> e micropropagação .....	29
2. Enraizamento <i>ex vitro</i> .....	32
3. Enraizamento <i>in vitro</i> .....	33
3.1. Efeito da concentração de sacarose .....	33
3.2. Efeito da temperatura .....	34
4. Transplântio e aclimatação .....	35
 Capítulo II – Microtuberização em <i>Sinningia allagophylla</i> .....	49
Resumo .....	51
Introdução .....	52
Materiais e Métodos .....	56
Resultados e Discussão .....	58
 Capítulo III - Efeitos do alumínio no crescimento e na composição mineral de <i>S.allagophylla</i> cultivada <i>in vitro</i> .....	69
Resumo .....	71
Introdução .....	72
Materiais e Métodos .....	78
Resultados e Discussão .....	81
 Conclusão Geral .....	95
Literatura Citada .....	96
Apêndice .....	119

## ABREVIATURAS

**AIA:** Ácido 3-Indolacético

**AIB:** Ácido 3-Indolbutírico

**ANA:** Ácido Naftalenoacético

**BA:** 6-Benzilaminopurina

**B5:** Composição salina básica descrita por Gamborg *et al.* (1968) para o cultivo de células de soja

$\frac{1}{2}$  **B5:** Composição salina básica do meio B5, com a concentração original reduzida à metade

**MS:** Composição salina e de vitaminas descrita por Murashige & Skoog (1962), para o cultivo *in vitro* de *Nicotiana tabacum*, acrescido de 30 g/L de sacarose.

## LISTA DE FIGURAS

Inflorescência de <i>S. allagophylla</i> . Flores pequenas, tubulosas, em cachos terminais.....	6
<i>S. allagophylla</i> em Campo Cerrado do Parque Estadual de Vaçununga (SP) e em afloramentos rochosos da Mata Atlântica (Serra da Mantiqueira, SP).....	8
Prof. Dr. Leopoldo M. Coutinho em aula de campo no Parque Estadual de Vaçununga, Gleba Pé de Gigante (SP).....	10
<i>S. allagophylla</i> cultivada <i>in vitro</i> .....	12
Esquema do estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i> de <i>S. allagophylla</i> a partir de sementes.....	24
Broto em caule único de <i>S. allagophylla</i> .....	30
Efeito da concentração de sacarose sobre o número de raízes e na presença de raízes secundárias em microplantas de <i>S. allagophylla</i> .....	40
Efeito da temperatura sobre o número de raízes e na produção de raízes secundárias em microplantas de <i>S. allagophylla</i> .....	42
Efeito da temperatura sobre a produção de tubérculo em microplantas de <i>S. allagophylla</i> .....	44
Presença do microtubérculo e raízes adventícias em microplanta de <i>S. allagophylla</i> crescida <i>in vitro</i> .....	46
<i>S. allagophylla</i> crescida em meio sem a presença de ANA e sob a mistura de luz fluorescente com incandescente (F + I).....	60
Efeito da luz fluorescente (F) ou fluorescente + incandescente (F + I) e da concentração de ANA sobre a produção e sobre o diâmetro médio dos microtubérculos em <i>S. allagophylla</i> .....	64

Efeito da luz fluorescente (F) ou fluorescente + incandescente (F + I) e da concentração de ANA sobre a produção de raízes secundárias em <i>S. allagophylla</i> .....	66
Microplanta de <i>S. allagophylla</i> cultivada <i>in vitro</i> com 50 e 200 $\mu\text{M}$ de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ .....	86
Efeito do alumínio sobre a produção de raízes secundárias e de microtubérculos em <i>S. allagophylla</i> .....	88
Teores de alumínio e de manganês na parte aérea de <i>S. allagophylla</i> cultivada <i>in vitro</i> .....	92

## LISTA DE TABELAS

Efeito de diferentes concentrações da sacarose sobre o crescimento <i>in vitro</i> de <i>S. allagophylla</i> .....	37
Efeito de diferentes temperaturas sobre o crescimento <i>in vitro</i> de <i>S. allagophylla</i> .....	38
Diâmetro dos microtubérculos de <i>S. allagophylla</i> cultivada <i>in vitro</i> , no final da 1ª e da 2ª fases do transplantio.....	39
Combinações de diferentes concentrações de ANA com diferentes tratamentos de luz.....	57
Efeito da luz fluorescente (F) ou fluorescente + incandescente (F + I) e da concentração de ANA sobre o crescimento <i>in vitro</i> de <i>S. allagophylla</i> .....	62
Efeito da luz fluorescente (F) ou fluorescente + incandescente (F + I) e da concentração de ANA sobre a massa fresca e massa seca da microplanta inteira de <i>S. allagophylla</i> cultivada <i>in vitro</i> .....	63
Tratamentos com diferentes concentrações de sais de fosfato e de alumínio.....	77
Efeito do alumínio [Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .18H <sub>2</sub> O] sobre o crescimento <i>in vitro</i> de <i>S. allagophylla</i> em um período de 60 dias.....	85
Efeito do alumínio [Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .18H <sub>2</sub> O] sobre o crescimento <i>in vitro</i> de <i>S. allagophylla</i> em um período de 120 dias.....	90
Massa fresca e massa seca de <i>S. allagophylla</i> cultivadas <i>in vitro</i> na presença de alumínio [Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .18H <sub>2</sub> O].....	91
Resultado da análise química da parte aérea das microplantas de <i>S. allagophylla</i> .....	94

## RESUMO GERAL

*Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae) é uma herbácea perene amplamente distribuída no Brasil, encontrada principalmente em formações campestres do Cerrado, bem como em alguns afloramentos rochosos da Mata Atlântica, crescendo, assim, em ambiente inóspito (sujeito à seca e ao fogo, em solos ácidos, deficientes em nutrientes e com teores elevados de alumínio e de manganês). Como outras espécies do Cerrado, apresenta fases fenológicas bem definidas: no outono as partes aéreas das plantas morrem e o órgão subterrâneo passa por um período de dormência no inverno, seguido por um período de rápida brotação na primavera. É uma espécie com potencial ornamental e o tubérculo que produz possui potencial exploração econômica pelo conteúdo de carboidratos que apresenta. Também é ecologicamente importante como fonte de néctar para beija-flores.

Estudos anteriores mostraram que *S. allagophylla* responde de forma satisfatória ao cultivo *in vitro*, podendo ser obtido em um curto período um número grande de plantas. Entretanto, em tais estudos as microplantas não produziram o microtubérculo que apresentam *in natura* e um sistema radicular desenvolvido, estes necessários para a produção de mudas da espécie, disponíveis o ano todo, para a sua comercialização, preservação e para a realização de estudos fisiológicos. Para tanto, foram realizados estudos utilizando-se como explantes segmentos nodais da região mediana do caule de plântulas, estas resultantes da germinação *in vitro* de sementes da espécie. As sementes foram obtidas a partir de plantas crescidas em área de Campo Cerrado (solos com valor de pH 3,9, com baixos teores de nutrientes e altos para alumínio trocável), da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (22° 15-16' S e 47° 8-12' W, 585 – 635 m de altitude), SP.

Investigações *in vitro* de vários aspectos da presença de alumínio no cultivo de *S. allagophylla*, bem como do enraizamento e da tuberização, resultaram três experimentos, estes realizados com explantes cultivados em meio líquido ½ B5, com valor de pH 4,6 e fotoperíodo de 16 h. No primeiro experimento verificou-se o efeito da concentração de sacarose e de diferentes temperaturas na produção de raízes adventícias e de microtubérculos. No segundo experimento procurou-se obter uma melhor produção de microtubérculos pelas microplantas, tendo sido testados os efeitos do regulador de crescimento ANA e da intensidade luminosa. Já no terceiro experimento foram avaliadas as respostas da espécie ao estresse do alumínio, bem como para a deficiência de nutrientes e baixo valor do pH.

Os resultados obtidos foram: (a) maior concentração de sacarose (40 g/kg) que a usada no meio padrão MS (30 g/kg) promoveu a produção de raízes adventícias em *S. allagophylla*; (b) a temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  no período de luz e  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  no período de escuro apresentou um efeito indutor no crescimento radicular e na produção de microtubérculos pela microplanta; (c) a aclimação bem sucedida ocorreu apenas nas microplantas apresentando microtubérculos com diâmetro aproximado de 8,0 mm, num período de cultivo de pelo menos 120 dias; (d) A presença do regulador de crescimento ANA, suplementado ao meio de cultivo, foi tóxico, induzindo a formação de calo na base da microplanta e de clorose nas folhas; (e) a mistura de luz fluorescente com incandescente (F+I) induziu a produção de microtubérculos e estes com diâmetro maior; (f) o efeito do alumínio sobre o crescimento da microplanta dependeu da concentração testada: em  $200 \mu\text{M}$  ocorreu clorose nas folhas e necrose nas extremidades das raízes, cessando o crescimento das microplantas; em  $100 \mu\text{M}$  não ocorreram sintomas de toxicidade, o crescimento das microplantas não foi prejudicado e, ao contrário, ocorreu um crescimento significativamente maior do diâmetro do microtubérculo e uma tendência, em nível não significativo, de maior crescimento do sistema radicular; (g) as

análises químicas da parte aérea das microplantas revelaram um acúmulo de alumínio e de manganês, em mais de 1000 mg/kg e de 300 mg/kg, respectivamente, não apresentando deficiência dos demais nutrientes e (h) com o aumento da concentração de alumínio no meio, de 50  $\mu$ M para 100  $\mu$ M, ocorreu um maior acúmulo, tanto de alumínio como de manganês, na parte aérea das microplantas.

Os resultados obtidos permitiram a elaboração de um protocolo de micropropagação para *S. allagophylla*, o qual torna possível a produção de mudas homogêneas da espécie. Também, demonstrou que *S. allagophylla* é uma espécie acumuladora de alumínio e de manganês e é eficiente na absorção dos nutrientes presentes em substratos com deficiências minerais, com baixo valor do pH e com alumínio disponível. A espécie apresenta, assim, estratégias que permitem a sua sobrevivência nas condições a que está sujeita no bioma Cerrado.

## SUMMARY

*Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae) is a perennial herb found throughout Brazil, found mainly in the Cerrado, and also in rocky outcrops within the Atlantic forest, growing in environments subject to drought, fire and soils with low pH, deficient in nutrients and with high aluminium and manganese saturation. As other plants of the Cerrado, it is characterized by well defined phenological phases: in autumn, the aerial parts of the plants die and the underground organs remain dormant throughout winter, followed by a rapid sprouting period at the beginning of spring. The species presents ornamental potential and possesses a tuber with potential use for economic exploitation due to the carbohydrates content present and it is ecologically important as nectar source for hummingbirds.

Earlier studies showed that *in vitro* propagation of *S. allagophylla* is successful, with rapid propagation of plants. However, the formation of adventitious roots and microtuber is difficult but necessary for seedling production, including commercial production, preservation and for ecophysiological studies. Therefore, studies were developed using nodal segment explants, obtained the germination of *in vitro* seedlings. The seeds were collected from plants growing in “campo cerrado” (soil with pH 3,9, low nutrient availability and high aluminium content), of the Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (22° 15-16’ S e 47° 8-12’ W, 585 – 635 m of altitude), SP, Brazil.

Research of various aspects of rooting, microtuber induction and interface of aluminium presence *in vitro* cultivation was made in *S. allagophylla*. From those results, three experiments were performed with explants cultivated in liquid ½ B5 medium with pH 4,6 and under 16 h photoperiod. The first experiment examined the effect of sucrose concentration and different temperatures on adventitious roots and microtubers production. The second experiment aimed to improve microtubers production, by testing the effects of the growth

regulator ANA and light intensity. In the third experiment responses of the species to aluminum stress, as well as nutrient deficiency and low pH condition were tested.

The results show that: (a) higher sucrose concentration (40 g/kg) than the standard MS medium (30 g/kg) optimized *in vitro* adventitious roots production; (b) temperature of  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  in the light period and  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  in the dark period induced rooting and microtubers formation *in vitro*; (c) successful acclimatization occurred in microplants that produced microtubers with diameters around 8.0 mm, for a cultivation period of at least 120 days; (d) the growth regulator ANA, when inoculated to the medium was toxic, inducing callus formation in the base of the microplant and chlorosis in the leaves; (e) mixture of fluorescent with incandescent light (F+I) induced microtuber production, and stimulated larger diameters of these; (f) aluminium effect depended on the concentration: 200  $\mu\text{M}$  was toxic, causing foliar chlorosis and root necrosis, ceasing the growth of microplants; while 100  $\mu\text{M}$  did not produce toxic symptoms; in fact, there was a significant positive effect on the growth of microtubers (larger diameter) and in larger rooting, but not to a significant statistical level (g) chemical analysis of the aerial part of the microplants revealed aluminium and manganese accumulation, in more than 1000 mg/kg and 300 mg/kg, respectively, without any deficiency in concentrations of other nutrients and (h) the increase of concentration of aluminium in the medium, from 50  $\mu\text{M}$  to 100  $\mu\text{M}$ , resulted in a higher aluminium and manganese accumulation in aerial part of microplants.

These *in vitro* studies allowed the elaboration of a protocol for *in vitro* propagation of *S. allagophylla* that makes possible the production of homogeneous seedlings of the species. Besides demonstrated that *S. allagophylla* is an aluminium and manganese accumulator and efficient in absorbing of the nutrients present in a substratum poor in these, with low pH values

and considerable aluminium concentration. Therefore it is a species with strategies that allow its survival in Cerrado conditions.

## INTRODUÇÃO GERAL

O bioma Cerrado é um tipo de vegetação própria do Brasil, com apenas algumas extensões alcançando a Bolívia e o Paraguai, abrigando uma importante diversidade biológica, com um número significativo de espécies endêmicas (Ratter *et al.*, 1997). É um bioma que se encontra bastante ameaçado, com espécies importantes comercial e ecologicamente desaparecendo em função da desordenada expansão urbana e agropecuária, bem como pela exploração irracional.

Estima-se que nos últimos 40 anos, o Cerrado teve cerca de 60% da sua cobertura vegetal primitiva substituída por coberturas artificiais, notadamente pastagens e lavouras, sendo que no Estado de São Paulo, porção do bioma que tem sido mais prejudicada, sua vegetação foi reduzida de 14% para menos de 1% da superfície do estado (Cavalcanti & Joly, 2002). Recentemente foi incluído na lista dos “hotspots”, áreas com grande endemismo e com menos de 30% da vegetação natural preservada, o que representa ser mundialmente reconhecido como um importante bioma do planeta a ser preservado (Cavalcanti & Joly, 2002).

De acordo com Myers *et al.* (2000), menos de 20% do Cerrado permanece intocado, tendo um caráter de urgência a sua conservação, pois além da biodiversidade que apresenta, é importante como corredor para espécies de biomas vizinhos, tais como a Florestas Amazônica e Atlântica.

Para reverter o processo de degradação das terras em áreas de Cerrado, com a manutenção da produtividade e integridade ambiental, sugere-se a avaliação econômica de espécies que podem ser exploradas como recurso genético, alimento, medicamentos, fonte de energia, emprego em paisagismo e outras utilidades. Para tanto, tem sido proposta a integração do setor científico com o produtivo, tendo como medidas tanto o incentivo de estudos básicos de fisiologia, bioquímica e de biotecnologia, quanto programas de levantamento e cultivo de

espécies economicamente viáveis, com produção em larga escala nas áreas do cerrado (Zaidan & Figueiredo-Ribeiro, 1995).

A cultura de tecidos vegetais tem sido considerada uma ferramenta promissora para a preservação de fontes vegetais, pois facilita a distribuição de material das espécies ameaçadas e permite a formação de banco de genes. Através da micropropagação o cultivo das espécies pode ser viabilizado em menos tempo, tanto para a recuperação do ambiente, como para o cultivo comercial das espécies com potencial econômico (Fay, 1992; Kane *et al.*, 2000; Pletsch, 2003). Jardins Botânicos e Instituições de diferentes países têm utilizado as técnicas *in vitro* como medidas de conservação de espécies ameaçadas, com uma ampla variedade de espécies sendo propagadas de forma bem sucedida através do cultivo *in vitro* (Fay, 1992).

No Brasil, poucos são os relatos do emprego da técnica de cultura *in vitro* visando à conservação de espécies ameaçadas, tendo-se alguns estudos com espécies do Cerrado, como com o barbatimão (França *et al.*, 1995), com *Gomphrena macrocephala* (Moreira *et al.*, 1999), *Anemopaegma arvense* (Pereira *et al.*, 2003) e espécies citadas em Melo *et al.* (1998). Também com espécies da família Bromeliaceae (Mercier & Kerbauy, 1998). Os resultados obtidos de tais estudos são promissores para se acreditar que a continuidade das pesquisas nesta área trarão benefícios significativos para o plantio de espécies selecionadas (Melo *et al.*, 1998).

A vegetação do Cerrado é característica e diferenciada da dos biomas adjacentes, possuindo estratégias adaptativas que superam os efeitos do fogo, bem como o estresse térmico, hídrico e nutricional a que está sujeita (Mantovani & Martins, 1988). O componente herbáceo (76,7%) é predominante sobre o arbustivo e o arbóreo, com as espécies herbáceas apresentado como características: raízes profundas, sendo por este motivo na maior parte espécies perenes; caules e folhas com tecidos espessados e cerca de 50% delas, produzem um órgão subterrâneo que permite a sua sobrevivência em condições adversas (seca e presença do fogo) (Filgueiras, 2002). Estudos efetuados consideram que a vegetação nativa do Cerrado

apresenta as características típicas não pela falta de água, mas devido aos fatores edáficos, como a acidez do solo, a deficiência de nutrientes e os altos teores de alumínio (Franco, 2002).

O órgão subterrâneo presente nas herbáceas constitui uma grande fonte de carboidratos e outros compostos de reserva, sendo geralmente capazes de reprodução vegetativa (Rizzini, 1997). Segundo Coutinho (1990), é principalmente a multiplicação vegetativa dos órgãos subterrâneos que mantém a renovação das plantas do Cerrado, em especial nas condições atuais da intervenção humana. Essas herbáceas perdem gradualmente a parte aérea no outono, passam por um período de dormência no inverno, seguida de intensa e rápida brotação das gemas presentes nos órgãos subterrâneos, na primavera e verão.

*S. allagophylla*, espécie da família Gesneriaceae, conhecida como batata-perdiz, é uma herbácea perene, com caule ereto, simples, piloso, com um a vários ramos partindo de um órgão subterrâneo (tubérculo inteiro ou plurilobado). As folhas são pilosas, 3-verticiladas e as flores são pequenas, tubulosas, de corola entre o abóbora e o vermelho, reunidas em cachos terminais, de 25-30 cm de comprimento (figura 1). Fruto em cápsula cônica, marrom (Ferri, 1969; Chautems, 2003; Durigan *et al.*, 2004). Ocorre nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste do Brasil; no Paraguai e na Argentina. Taxonomicamente, é considerada sinônimo de *S. tribracteata*, enquanto *Rechsteineria spicata* e *R. tribracteata*, antes consideradas sinônimas, são inválidas (Chautems, 2003).

*S. allagophylla* cresce principalmente nas formações campestres do Cerrado (Durigan *et al.*, 2004), sendo também encontrada em afloramentos rochosos da Mata Atlântica, como observado na Serra da Mantiqueira (SP) (Buzato *et al.*, 2000; Perret *et al.*, 2001) (figura 2); na Serra da Graciosa (PR) (Peixoto & Salviani, 2003) e no Estado do Rio de Janeiro (Lopes *et al.*, 2004), bem como em afloramentos rochosos de formações ruprestes na região Centro-Sul do Paraná (Ziller, 2003).

Muitas espécies do gênero *Sinningia* (conhecidas como rainha-do-abismo), estão ameaçadas de extinção por serem empregadas como ornamentais, sendo seus tubérculos retirados de populações selvagens para serem comercializados (Chautems, 2003; Peixoto & Salviani, 2002). Ziller (2003), através de um levantamento da flora do Parque Estadual de Vila Velha (PR), observou que *S. allagophylla*, juntamente com *S. macropoda*, apresenta uma forte tendência de desaparecimento pelo interesse ornamental, sendo encontrada apenas em áreas isoladas do parque, sem o acesso fácil da população humana.

*S. allagophylla*, como outras espécies do gênero, além da importância econômica por seu potencial ornamental, possui importância no aspecto ecológico, por ser fonte de néctar para beija-flores, como o beija-flor-papo-branco (*Leucochloris albicollis*), exemplo daqueles que visitam com frequência as suas flores (Pellazzo & Both, 1993; Buzato *et al.*, 2000; Perret *et al.*, 2001). Tais aspectos fazem de *S. allagophylla* uma espécie a ser preservada. Além disso, Figueiredo-Ribeiro *et al.* (1986) encontraram altos teores de carboidratos em seus tubérculos e Septímio (1994) citou que suas folhas e flores têm uso popular como depurativo, febrífugo e diurético, o que torna a espécie interessante para estudos fisiológicos e farmacológicos.

Estudos fenológicos realizados por Almeida (1994), mostraram que *S. allagophylla* é uma planta perene com ciclo anual, que cresce, floresce e, em seguida, tem uma perda gradual da parte aérea durante a estação seca (outono e inverno). As gemas permanecem dormentes nos órgãos subterrâneos, e o brotamento ocorre quando as condições ambientais se tornam favoráveis (na primavera). Leopoldo M. Coutinho (comunicação pessoal), considera *S. allagophylla* como exemplo de espécie adaptada à presença do fogo, apresentando brotação e floração após queimada natural (figura 3), característica observada em um grande número de espécies crescidas no Cerrado (Miranda *et al.*, 2002).

A reprodução de *S. allagophylla* se dá por sementes, entretanto o seu crescimento é lento, demorando dez meses do rebrotamento até o período de floração em casa de vegetação,

quando as sementes poderiam ser coletadas para a obtenção de novas plantas (Almeida, 1994). A propagação vegetativa por fragmentos do órgão subterrâneo não pareceu ser possível (Almeida, 1994), enquanto pela micropropagação pode-se obter, em curto espaço de tempo, material vegetal suficiente para a realização de estudos, pois a espécie responde favoravelmente às condições de cultivo *in vitro*.

Dos estudos *in vitro* realizados com a espécie, por Almeida & Shepherd (1999) e por Gomes & Shepherd (2000; 2002), verificou-se que o meio ideal para o seu crescimento é o ½ B5 (Gamborg *et al.*, 1968) na forma líquida, com pH variando de 4,4 para 4,6 e sem a presença de reguladores de crescimento. Embora tenha ocorrido o crescimento *in vitro* (figura 4), com a obtenção de grande número de microplantas em um período de 60 dias, sem recalitrância e com um custo mais baixo (sem ágar e reguladores de crescimento), não ocorreu a formação do tubérculo que a espécie produz *in natura*, bem como de um sistema radicular desenvolvido, condições necessárias para a produção de mudas e para a realização de estudos fisiológicos.

A micropropagação de *S. allagophylla* é uma ferramenta importante para a obtenção de mudas homogêneas, para a domesticação desta espécie com potencial econômico e para a sua preservação, como espécie nativa, ecologicamente importante e com ampla distribuição no Brasil. Vale ressaltar que, apesar dos protocolos de micropropagação serem elaborados para uma espécie em particular, existe grande afinidade morfológica e fenológica de *S. allagophylla* com outras espécies do mesmo gênero, como *S. aggregata*, *S. araneosa* e *S. warmingii*, e mesmo com outras herbáceas de Cerrado, de diferentes famílias, como *Vernonia herbácea* e *Viguiera discolor* (Asteraceae) e *Gomphrena macrocephala* (Amaranthaceae).

**Figura 1.** Inflorescência de *S. allagophylla*. Flores pequenas, tubulosas, em cachos terminais.

Fonte: Peixoto & Salviani, 2003.



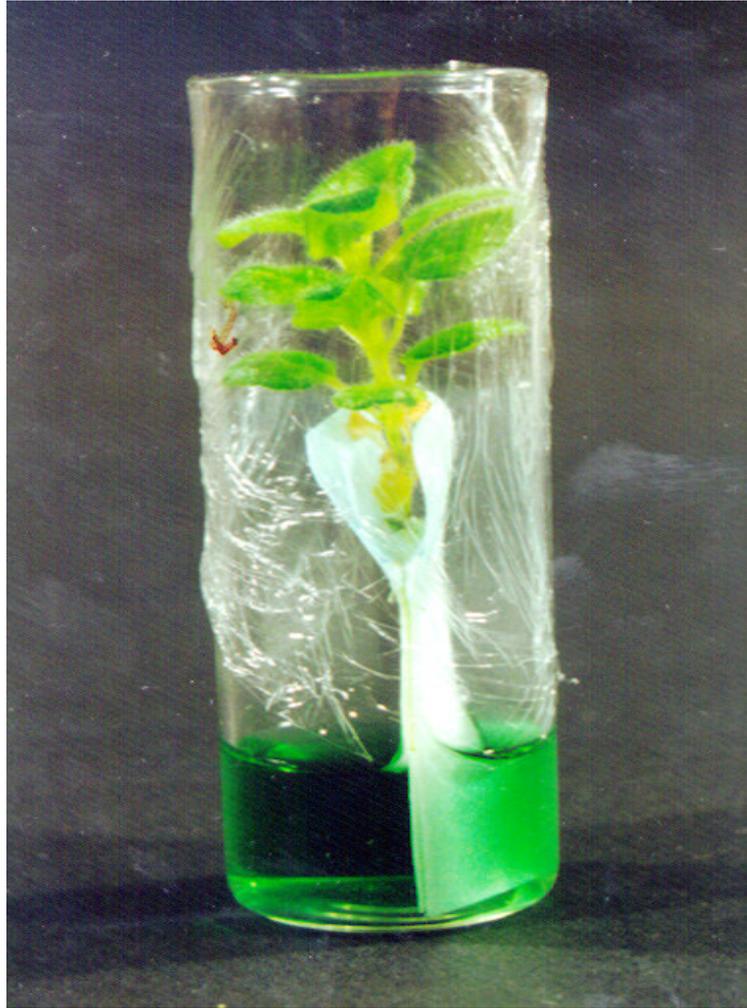
**Figura 2.** *S. allagophylla* em Campo Cerrado do Parque Estadual de Vaçununga (SP) e em afloramentos rochosos da Mata Atlântica (Serra da Mantiqueira, SP).



**Figura 3.** Prof. Dr. Leopoldo M. Coutinho em aula de campo no Parque Estadual de Vaçununga, Gleba Pé de Gigante (SP), mostrando uma planta de *S. allagophylla*.



**Figura 4.** *S. allagophylla* cultivada *in vitro*. Cultivo por um período de 60 dias em meio líquido ½ B5, sem reguladores de crescimento, em pH 4,6 e fotoperíodo de 16 h. Microplanta sem microtubérculo e com pequeno número de raízes.



## OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivos:

- 1) A produção *in vitro* de raízes adventícias, bem como a tuberização em plantas de *S. allagophylla* cultivadas *in vitro*, visando obter mudas homogêneas da espécie, disponíveis o ano todo.
- 2) Estudos fisiológicos, com a avaliação das respostas de *S. allagophylla in vitro* às condições ambientais a que está normalmente sujeita: substrato com baixo valor de pH, com deficiência de nutrientes e com alto teor de alumínio.

## **CAPÍTULO 1**

### **Enraizamento, micropropagação e aclimação de *Sinningia allagophylla***

## RESUMO

Este trabalho teve por objetivo analisar os efeitos da concentração de sacarose e da temperatura na formação *in vitro* de raízes adventícias e de microtubérculos em *S. allagophylla*. O explante consistiu de segmentos nodais de plântulas germinadas *in vitro*, a partir de sementes coletadas de plantas crescidas em Campo Cerrado, na Reserva Biológica de Moji Guaçu (SP). Os explantes foram cultivados em meio líquido ½ B5, com pH 4,6 e fotoperíodo de 16 horas, durante 90 dias. No primeiro experimento fez-se o cultivo dos explantes em três concentrações de sacarose: 30g/L, 40 g/L e 60 g/L, obtendo-se maior número de raízes e presença de raízes secundárias na concentração de 40 g/L, com um número significativamente maior de raízes secundárias. No segundo experimento, os explantes foram cultivadas no meio já citado, suplementado com 40 g/L de sacarose e recebendo diferentes tratamentos de temperatura: (T1)  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , (T2)  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  no período de luz e  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  no período de escuro; (T3)  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e (T4)  $15 \pm 2^\circ\text{C}$ . Observou-se um aumento significativo do número de raízes e da presença de raízes secundárias nos tratamentos T2 e T3. Em T2, além do melhor desenvolvimento radicular, ocorreu maior produção de folhas e um maior número de microplantas produziram microtubérculo, de forma significativa em relação às crescidas nos demais tratamentos. Em T4, houve o menor crescimento da parte aérea e da produção de microtubérculo. Na aclimação das plantas, sobreviveram apenas as que possuíam o microtubérculo de maior diâmetro (em torno de 8,0 mm). Para a obtenção tanto de enraizamento, como da formação *in vitro* de tubérculos em *S. allagophylla*, é necessária a suplementação de 40 g/L de sacarose ao meio de crescimento e o cultivo em temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  no período de luz e  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  no período de escuro.

## INTRODUÇÃO

O bioma Cerrado está entre os mais ricos em espécies de plantas com importância econômica, como medicinais, ornamentais, produtoras de frutos, entre outras. Muitas espécies estão em risco de extinção e a propagação de tais plantas por cultura de tecidos pode ser considerada uma ferramenta promissora, tanto para a preservação, como para a propagação comercial, e constitui atualmente a modalidade de maior interesse e aplicação na propagação de plantas nativas do Cerrado (Melo *et al.*, 1998).

*S. allagophylla*, uma herbácea com potencial ornamental, que cresce principalmente em fisionomias campestres do Cerrado (Durigan *et al.*, 2004), responde de forma favorável às condições de cultivo *in vitro*. Entretanto, apresenta dificuldade de formação de raízes e de tubérculos durante a micropropagação (Almeida, 1994; Gomes, 1999). A dificuldade de enraizamento *in vitro* foi também observada em algumas outras espécies que crescem no cerrado, como em brotos de caviúna-do-cerrado (Pereira de Sá, 1991) e de barbatimão (França *et al.*, 1995).

A formação de raízes adventícias é um dos maiores obstáculos para o sucesso de protocolos de micropropagação. O enraizamento da microestaca é frequentemente difícil e pode ser obtido *in vitro* ou *ex vitro*. No primeiro, as raízes são regeneradas em condições assépticas e a planta completa é transplantada para o substrato. No segundo, as partes aéreas são manipuladas como microestacas e todo o processo de enraizamento se dá em substrato.

No enraizamento *ex vitro* algumas perdas podem ocorrer, mas o maior custo de laboratório para a obtenção de enraizamento *in vitro* torna a proposta de enraizamento *ex vitro* atrativa (Deberg, 2000), tendo sido realizado com sucesso para algumas espécies, como *Castanea sativa* (Mullins, 1987), *Dianthus caryophyllus* (Cuzzuol *et al.*, 1996), *Anemopaegma arvense* (Pereira *et al.*, 2003) e *Rubus chamaemorus* (Martinussen *et al.*, 2004).

Os métodos normalmente utilizados para o enraizamento *in vitro* fazem o uso do meio MS solidificado com ágar e suplementado com auxinas, principalmente o AIB, isoladas ou combinadas entre si (Koroch *et al.*, 1997; Calamar & De Klerk, 2002; Štajner *et al.*, 2002; Newell *et al.*, 2003; Sarowar *et al.*, 2003). Os dois estágios da rizogênese, iniciação da raiz e alongamento, são normalmente considerados, utilizando-se meios de cultura distintos, com uma primeira fase em que as plantas permanecem de algumas horas até alguns dias em meio com auxinas e uma segunda fase, sem a presença de fitorreguladores (Yu *et al.* 2000; Newell *et al.*, 2003; Nand *et al.*, 2004). Esse procedimento possui elevado custo final da planta micropropagada e o ideal é buscar um meio e condição física que permitam o transcorrer das etapas do enraizamento (Grattapaglia & Machado, 1990).

As auxinas têm sido amplamente utilizadas para a produção *in vitro* de raízes adventícias. Elas induzem a formação de um meristema de raiz, divisões e alongamento das células, induzindo assim a formação de primórdios radiculares (De Klerk, 2002). Entretanto, alguns trabalhos demonstram que a sua presença não melhora significativamente os resultados, ou mesmo, é prejudicial, induzindo em algumas espécies a formação de calo na base dos brotos, além de clorose nas folhas, necrose das pontas dos brotos e abscisão foliar (França *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 2000; Grigoriadou *et al.*, 2002; Pereira & Fortes, 2003).

Diversas espécies, principalmente as herbáceas, enraízam em meio basal sem reguladores de crescimento (Cuzzuol *et al.*, 1996; Catapan *et al.*, 2001; Barboza *et al.*, 2004; Martinussen *et al.*, 2004). É uma prática econômica e desejável na automação da micropropagação. O enraizamento sem reguladores de crescimento é uma indicação de que níveis endógenos necessários já estão presentes nos explantes originais (Catapan *et al.*, 2001).

Para o enraizamento *in vitro*, é freqüente o uso de meio básico com ágar e há evidências de que este não é o meio ideal, pois além de ser mais caro e trabalhoso, as raízes que crescem neste meio são frágeis, difíceis de serem transplantadas e geralmente não são funcionais, com

pêlos radiculares insuficientes e com poucas conexões com o caule das estacas (Zimmerman, 1988). A baixa concentração do gás oxigênio no meio com ágar possivelmente contribui com o crescimento anormal das raízes (Newell *et al.*, 2003). Outros substratos além do ágar , incluindo espuma (Gebhardt, 1985; Roche *et al.*, 1996), turfa (Gebhardt & Friedrich, 1987), areia (Newell *et al.*, 2003) e vermiculita (Rugini & Verma, 1982; Yu *et al.*, 2000), proporcionam melhor aeração e têm sido usados para superar os problemas de enraizamento em ágar e elevar a sobrevivência no transplântio.

Sistemas de micropropagação em cultura líquida têm sido indicados para aumentar a qualidade da planta, pois tendem a estimular a formação de um sistema radicular mais completo, devido à aeração que proporciona, além de tornar mais disponíveis os nutrientes (Grattapaglia & Machado, 1990). A aeração é mantida com o uso de ponte de papel filtro ou com a agitação do meio. Diversas espécies têm sido cultivadas neste meio, apresentando crescimento mais rápido, desenvolvimento de sistema radicular saudável e sucesso na aclimação (Offord & Campbell, 1992; Adelberg *et al.*, 2000; Pereira & Fortes, 2003; Gollagunta *et al.*, 2004).

Diluições das formulações básicas utilizadas na micropropagação, geralmente o meio MS, têm demonstrado serem eficientes para o enraizamento (Pereira *et al.*, 2000). Altas concentrações de sais tendem a inibir as fases de enraizamento (Grattapaglia & Machado, 1990).

Em cultura de tecidos, uma concentração maior de sacarose do que a usada na micropropagação (30 g/L), é geralmente utilizada em tratamentos de enraizamento, visando o fornecimento de energia, que é indispensável para a rizogênese. Há poucos estudos do efeito da sacarose na formação de órgãos adventícios. Segundo Meir *et al.* (1985), a sacarose aumenta a produção de etileno nos tecidos da planta e este, por sua vez, deixa as células sensíveis em responder para auxinas. De Klerk *et al.* (1999) e Calamar e De Klerk (2002)

concluíram, em estudos com o cultivo *in vitro* de plantas de maçã, que uma concentração maior de sacarose (70 g/L) eleva a susceptibilidade das células para responder à auxina e para formar raízes.

Duas outras estratégias para aumentar a capacidade de enraizamento de microestacas, citadas em alguns trabalhos, são a indução de alongamento dos brotos (Pereira de Sá, 1991; De Klerk, 2002) e o rejuvenescimento por subcultivo repetido (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 2001; Monteuis, 2001).

Novas propostas de tratamentos para a formação *in vitro* de raízes adventícias são altamente importantes, pois além do uso de auxinas, nenhum outro tratamento novo é amplamente aplicável. É necessário o desenvolvimento de novas pesquisas que indiquem procedimentos de menor custo e mais eficazes que os métodos tradicionais (De Klerk, 2002).

O objetivo deste estudo foi o de otimizar o protocolo de micropropagação de *S. allagophylla*, visando à formação de raízes adventícias, o que resultaria em produção de mudas homogêneas viáveis durante todo o ano.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Material vegetal

Sementes da espécie *S. allagophylla* foram coletadas em dezembro de 1999, de plantas crescidas em área de Campo Cerrado, da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (22° 15-16'S e 47° 8-12'W, 585 – 635 m de altitude), no estado de São Paulo. As plantas, a partir das quais foram feitas as coletas, formavam uma população de onze indivíduos distribuídos em três áreas, cada uma em torno de 10 m<sup>2</sup>, separadas por uma distância aproximada de 20 m. Após a colheita, as sementes foram colocadas em frascos escuros e levadas para o Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp, onde os experimentos foram realizados.

### 2. Desinfestação das sementes

As sementes foram colocadas em sacos de algodão fechados, o qual foi imerso em solução fungicida Benlate (Benomyl) 1% (p/v), onde permaneceu sob agitação contínua por 10 minutos num agitador rotativo.

A partir desta etapa todo o material foi manipulado em capela de fluxo laminar, em condições assépticas, utilizando vidrarias e pinças previamente esterilizadas. O saco com as sementes foi mantido por 20 minutos em solução etanol 70% e, em seguida, retirado o etanol, foi colocado em uma solução de hipoclorito de sódio 1% (p/v), com uma gota de Tween-20, permanecendo sob agitação contínua por 12 minutos. Com a retirada do hipoclorito de sódio, os sacos foram lavados em água destilada estéril, abertos, as sementes retiradas e colocadas para secagem em papel filtro estéril. As sementes desinfestadas foram inoculadas em frascos de vidro com 9,0 cm de altura e 8,0 cm de diâmetro, contendo 20 mL do meio de cultivo ½ B5

(Gamborg *et al.*, 1968) (apêndice I), suplementado com 30 g/L de sacarose e 8 g/L de ágar (Difco Bacto), pH ajustado para 4,8 com HCl e NaOH e autoclavados em temperatura de 121°C, por 20 minutos.

O valor do pH foi monitorado utilizando-se o indicador de verde bromocresol (5,0mL/L), adicionado ao meio quando do seu preparo. O indicador modifica a cor do meio de cultivo de acordo com o pH, variando da cor amarela (pH entre 3,0 e 3,8), para diferentes tonalidades do verde (pH entre 4,0 e 4,6) indo para diferentes tonalidades no azul (pH entre 4,8 e 5,6).

### **3. Condições de cultivo**

Frascos com as sementes (em torno de 50-60 em cada frasco) foram mantidos, para germinação e crescimento das plântulas, em câmara de crescimento Forma Scientific, com fotoperíodo de 16 h de luz, intensidade luminosa de 40  $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$  (proveniente de lâmpada fluorescente branca fria) e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### **4. Propagação das microplantas**

Após 8 a 10 semanas da germinação *in vitro*, as plântulas apresentando caule com 3 a 5 nós foram removidas e seccionadas, obtendo-se, a partir da região mediana do caule, segmentos nodais de aproximadamente 0,8 cm com um nó e um par de folhas, constituindo o explante. Os explantes nodais, assim obtidos, foram inoculados individualmente em tubos de ensaio de fundo chato, com 8,0 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, contendo 6,0 mL do meio de cultivo ½ B5, em estado líquido, suplementado com 30 g/L de sacarose e em pH 4,6, sendo mantidos nas mesmas condições da germinação *in vitro*. Como suporte foi usado papel filtro Whatman nº1.

Padronizou-se o valor de pH 4,6, por ter sido este o valor de pH que induziu o melhor crescimento de explantes de *S. allagophylla* em estudos anteriores (Gomes e Shepherd, 2000).

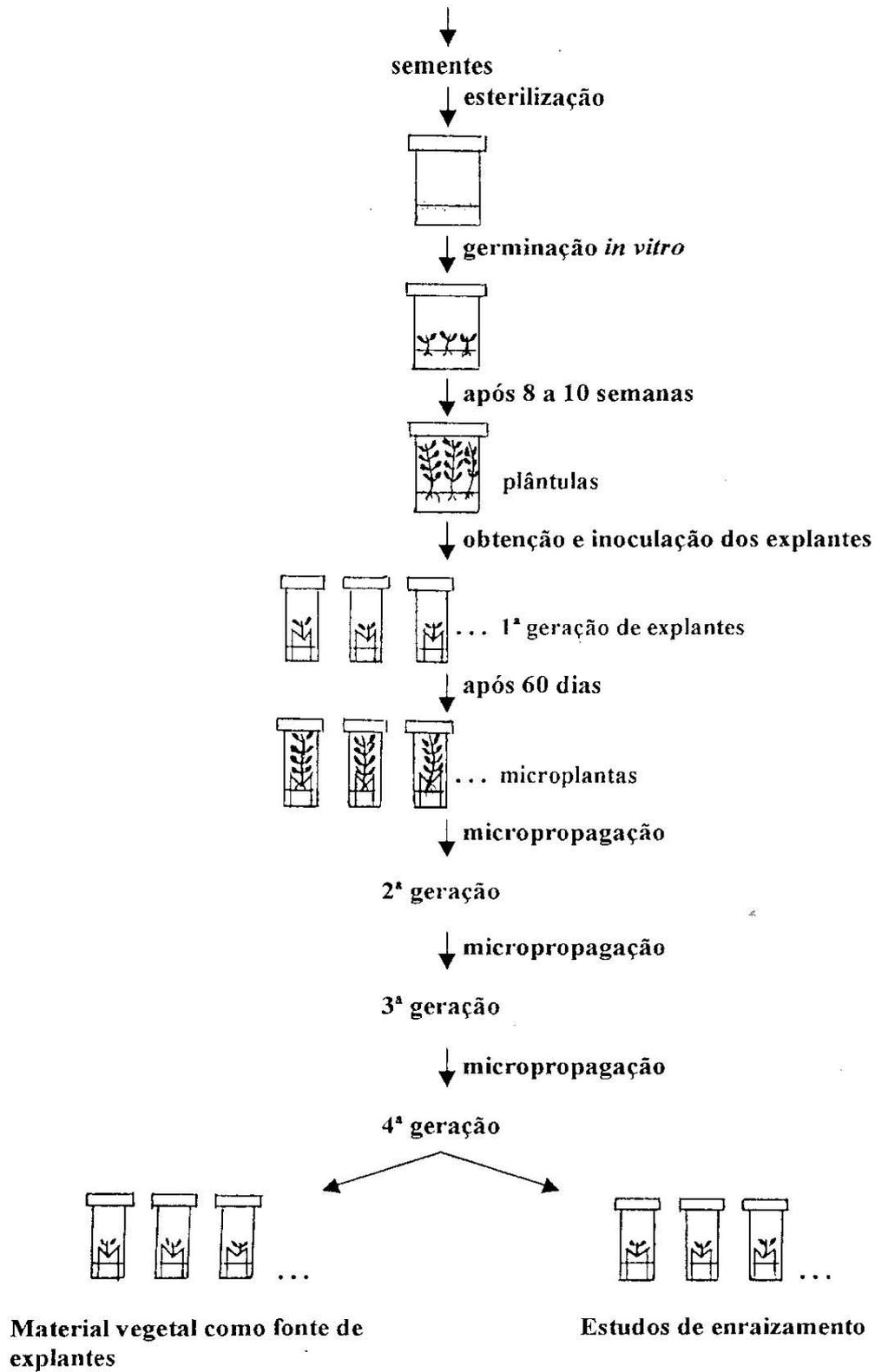
Após 60 dias de cultivo, da região mediana do caule das microplantas, foram obtidos novos explantes nodais, com 0,8 cm de comprimento e com um par de folhas, os quais foram micropropagados por mais duas gerações. Na quarta geração, os explantes obtidos foram utilizados como material vegetal para a realização de estudos de enraizamento (figura 1).

Uma fonte de explantes foi mantida, por meio de subcultivos, por mais três gerações, sendo em seguida descartada, obtendo-se novos explantes de sementes germinadas *in vitro*.

A propagação de microplantas, com três subcultivos, foi realizada para a obtenção de um número adequado de material vegetal e para a observação de possíveis variações nos clones. Após a sexta geração o material foi descartado, porque de acordo com De Klerk (2000) o material vegetal pode passar do estado juvenil para o estado maduro, após um número grande de subcultivos, o que dificulta o enraizamento.

**Figura 1.** Esquema do estabelecimento do cultivo *in vitro* de *S. allagophylla* a partir de sementes. O meio de cultivo para a germinação foi o meio sólido ½ B5, suplementado com 30g/L de sacarose e 8 g/L de ágar, em pH 4,8. O meio para a inoculação inicial do explante e para a micropropagação foi o meio líquido ½ B5, suplementado com 30 g/L de sacarose, em pH 4,6. As condições de cultivo foi: fotoperíodo de 16 h, temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ . Explantes consistiram de segmentos nodais, da região mediana do caule, com aproximadamente 0,8 cm de comprimento e com um par de folhas.

*S. allagophylla*  
(campo cerrado da Reserva Biológica de Moji Guaçu)



## **5. Enraizamento *ex vitro***

Microplantas mantidas no meio de micropropagação, com 6,0 cm de comprimento, seis não enraizadas e seis com raízes pouco desenvolvidas, foram transplantadas, individualmente, para copos plásticos de 200 mL, contendo o meio utilizado na micropropagação, sem a sacarose, e usando como suporte vermiculita autoclavada. As microplantas foram mantidas até 10 dias (no mês de fevereiro) em umidificador, com aspersão automática, em umidade em torno de 80% - 90%, com temperatura e luz ambiente, na Casa de Vegetação do Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp.

## **6. Enraizamento *in vitro***

Microplantas de 5,0 cm de comprimento, foram utilizadas para a obtenção de explantes nodais, os quais foram cultivados nas condições de meio de cultivo e de ambiente usadas na micropropagação, alterando-se a concentração de sacarose no meio e a temperatura. Para todos os tratamentos, a intensidade luminosa foi elevada para  $50 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e o período de cultivo foi de 90 dias, 60 dias em tubo de ensaio com 8,0 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro e os 30 dias restantes, em tubos de ensaio de 15 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro.

Os dados obtidos das características: comprimento da microplanta, número de folhas, número de raízes, o maior comprimento médio das raízes, massa fresca e massa seca das microplantas, foram analisados utilizando-se o programa ANOVA, por meio de comparação de médias pelo teste de Duncan. Para a análise estatística da produção de raízes secundárias e de tubérculo pelas microplantas, foi utilizado o *software* SAS (Statistical Analysis System) (SAS Institute, 1986).

### **6.1. Efeito da concentração de sacarose**

Para examinar o efeito da concentração de sacarose sobre o enraizamento, explantes foram inoculados em meio suplementado com 30 g/L, 40 g/L e 60 g/L de sacarose, com 12 repetições para cada tratamento.

### **6.2. Efeito da temperatura**

Para examinar se diferentes temperaturas podem ter efeito sobre o enraizamento, explantes foram mantidos em quatro tratamentos de temperaturas (T) diferentes:

$$T1 = 25 \pm 2^\circ\text{C};$$

$$T2 = 25 \pm 2^\circ\text{C} \text{ durante o período de luz e } 20 \pm 2^\circ\text{C} \text{ durante o período de escuro};$$

$$T3 = 20 \pm 2^\circ\text{C};$$

$$T4 = 15 \pm 2^\circ\text{C}.$$

Foram feitas 12 repetições para cada tratamento e no meio líquido ½ B5 utilizado foi acrescentado 40 g/L de sacarose (concentração encontrada como sendo a favorável para o enraizamento *in vitro* de *S. allagophylla*).

## **7. Transplântio e aclimação**

Microplantas crescidas nos diferentes tratamentos de temperatura foram aclimatadas, com transplântio em três fases:

**1ª Fase)** Retirada gradual das condições de assepsia e de alta umidade: microplantas foram inoculadas em frascos de vidro contendo o meio líquido ½ B5, suplementado com 40g/L de sacarose e com pH 4,6, utilizando como substrato vermiculita autoclavada. O frasco foi fechado com PVC e mantido nas mesmas condições. A partir da 4ª semana, a cada três dias, foram feitas perfurações na vedação de PVC, para a diminuição gradativa da umidade.

**2ª Fase)** Condições não assépticas e ambiente de alta umidade: no final da 6ª semana as microplantas, já em condições não assépticas, foram transferidas, individualmente, para copos plásticos de 200 mL, contendo vermiculita autoclavada, com o mesmo meio da 1ª fase, sem a sacarose. Foram mantidas por até quatro semanas em umidificador, em casa de vegetação, com temperatura e luz ambiente.

**3ª Fase)** Condições não assépticas, ambiente de alta umidade e solo do Cerrado e areia: plantas sobreviventes da 2ª fase foram transferidas para vasos individualizados, contendo uma mistura de solo do Cerrado, onde a planta foi coletada, e areia (7:3). As plantas permaneceram em bancada com aspersão automática, sendo irrigadas três vezes por semana com solução nutritiva de Hoogland & Arnon (1950) 40%, concentração considerada ideal para o crescimento de *S. allagophylla*, em estudos anteriores (Almeida, 1994).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Germinação *in vitro* e micropropagação

A germinação *in vitro* das sementes de *S. allagophylla* foi bem sucedida, com aproximadamente 90% de germinação em todos os frascos (de aproximadamente 50 sementes inoculadas, em torno de 45 germinaram), sem a presença de contaminação.

Os segmentos nodais, utilizados como explantes, produziram brotos de um único caule (figura 1), não ocorrendo a proliferação múltipla de brotos por explante (tufo na parte aérea). Assim, a micropropagação da espécie foi baseada na produção de microestacas, a partir de brotos novamente induzidos em um único caule.

Nas sucessivas micropropagações os clones, assim obtidos, foram fenotipicamente iguais.

**Figura 1.** Brotos em caule único de *S. allagophylla*. Microplanta resultante do crescimento *in vitro* do explante nodal, este cultivado em meio líquido ½ B5, suplementado de 30 g/L de sacarose, pH 4,6 e fotoperíodo de 16 h, durante um período de 60 dias.



## 2. Enraizamento *ex vitro*

O enraizamento *ex vitro* vem sendo proposto por representar uma redução de custos e pela melhor qualidade de raízes produzidas, pois, de acordo com Grattapaglia & Machado (1990), a regeneração de raízes diretamente no substrato tende a produzir um sistema radicular mais completo e funcional.

Algumas espécies possuem condições para o enraizamento *ex vitro* que, segundo McClelland & Smith (1988), está no arranjo vascular e na maior rigidez das raízes que produzem, como *Telopea speciosissima* (Offord & Campbell, 1992), *Dianthus caryophyllus* (Cuzzuol *et al.*, 1996), *Anemopaegma arvense* (Pereira *et al.*, 2003) e *Rubus chamaemorus* (Martinussen *et al.*, 2004). Entretanto, a maior parte dos tratamentos de indução do enraizamento, em plantas micropropagadas, é realizado *in vitro*. Segundo De Klerk (2002), o enraizamento *in vitro* tem como vantagens: facilitar a aclimação por adaptar as plantas a uma menor umidade e melhorar a absorção de água durante o início da aclimação; permitir que a planta tenha maior crescimento durante o tratamento, tornando-se menos vulnerável, bem como facilitar a adição de nutrientes e compostos que podem melhorar o desempenho da planta. De Klerk *et al.* (2001), em estudos com plantas de maçã e Cuzzuol *et al.* (1996), em estudos com plantas de cravo, observaram que a sobrevivência e o crescimento durante a aclimação foram menores nas plantas enraizadas *ex vitro*, que naquelas enraizadas *in vitro*.

No enraizamento *ex vitro* de *S. allagophylla*, ocorreu a morte de todas as plantas em um período de 10 dias. As causas da não sobrevivência podem ter sido a perda excessiva de água, a transferência direta de um meio heterotrófico para o autotrófico e a falta de desenvolvimento adequado para o transplante. O mesmo foi observado com tomate cultivado *in vitro* (S.L.K. Shepherd, comunicação pessoal).

### **3. Enraizamento *in vitro***

#### **3.1. Efeito da concentração de sacarose**

Em todos os tratamentos ocorreu 100% de enraizamento. As microplantas crescidas em meio com 40 g/L de sacarose apresentaram um número significativamente maior de raízes (tabela 1 e figura 2A) e com 100% das raízes apresentando raízes secundárias, enquanto as microplantas crescidas em meio com 30 g/L e 60 g/L de sacarose apresentaram, respectivamente, 60% e 40% com raízes secundárias (figura 2B). A massa fresca e massa seca também foram significativamente maior em 40 g/L. As demais características não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (tabela 1).

Em tratamentos anteriores realizados com a espécie, e mesmo no meio de micropropagação acima citado, as microplantas foram mantidas com 30 g/L de sacarose e apenas em torno de 10% delas enraizaram. A formação de raízes em 100% das microplantas neste estudo, talvez se deva ao período mais prolongado de cultivo e à transferência para tubos de ensaios mais altos, o que permitiu maior alongamento da microplanta e, assim, o enraizamento. Atualmente tem sido proposto o alongamento das microplantas como uma das possibilidades de elevar o enraizamento *in vitro* (De Klerk, 2002). Brotos de caviúna-do-cerrado, como obtido neste estudo, necessitaram de um período maior de cultivo para o enraizamento *in vitro* (Pereira de Sá, 1991).

A transferência para tubos de ensaios mais altos pode ter alterado a composição gasosa nos tubos, como um aumento na concentração de etileno, afetando o crescimento e o desenvolvimento das microplantas (Grattapaglia & Machado, 1990). Também, o aumento da intensidade luminosa nos tratamentos pode ter induzido o enraizamento, por elevar a taxa fotossintética. Em tratamentos de indução de enraizamento utiliza-se normalmente uma

intensidade luminosa mais alta, dando condições à planta de realizar fotossíntese (Grattapaglia & Machado, 1990).

O aumento na porcentagem de enraizamento, com o incremento da concentração de sacarose, tem sido relatado em alguns protocolos. Riquelme *et al.* (1991), estudando o efeito de várias concentrações de sacarose para o enraizamento *in vitro* de plantas de morango, batata, menta e uva, bem como Bondarev *et al.* (2003), em estudos com *Stevia rebaudiana*, e Štajner *et al.* (2002), com *Asparagus maritimus*, demonstraram que as concentrações entre 40g/L e 50 g/L são as mais adequadas para o enraizamento das espécies. Gollagunta *et al.* (2004) e Liao *et al.* (2004), defendem que um acréscimo na concentração de sacarose no meio não deve ser realizado apenas no estágio de enraizamento, mas durante todo o ciclo de crescimento do explante, tendo um efeito positivo na morfologia e na qualidade da planta. Tais resultados corroboram os encontrados neste estudo.

### **3.2. Efeito de diferentes temperaturas**

Em todos os tratamentos ocorreu 100% de enraizamento, com um número de raízes significativamente maior nos tratamentos T2 ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$  na luz e  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  no escuro) e T3 ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) ( $P= 0,001$ ) (tabela 2 e figura 3A). Também, nos tratamentos T2 e T3, um número significativamente maior de microplantas produziram raízes secundárias ( $P= 0,038$ ) (figura 3B).

A diminuição da temperatura no período escuro, fornecida no tratamento T2, foi favorável à produção de tubérculo, com a presença deste em um número significativamente maior de microplantas ( $P= 0,044$ ), em relação às crescidos nos demais tratamentos (figura 4). O número de folhas foi também significativamente maior em T2 ( $P= 0,001$ ), enquanto que o tratamento T4 inibiu o crescimento da parte aérea (tabela 2).

O melhor resultado de enraizamento obtido neste estudo concorda com o trabalho realizado por Newell *et al.* (2003), com a indução favorável de enraizamento em microestacas de espécies australianas, quando estas foram mantidas em 22°C no período de luz e 20°C no período de escuro. Já Martinussen *et al.* (2004), utilizaram a temperatura de 20°C em todo o tratamento *in vitro* para o enraizamento de *Rubus chamaemorus*. De acordo com Grattapaglia & Machado (1990), temperatura acima ou abaixo da temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , normalmente utilizada em cultivo *in vitro*, bem como uma alternância de temperatura mais alta durante o período claro e mais baixa no período escuro, pode ser favorável ao desenvolvimento de algumas espécies.

Quanto à formação de microtubérculos, foi também observado que o cultivo em temperaturas mais baixas que  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , normalmente utilizada, promoveu a microtuberização em *Solanum tuberosum* (Gopal *et al.*, 1998; Liu & Xie, 2001), em *Helianthus tuberosus* (Gamburg *et al.*, 1999) e em *Corydalis ambigua* (Hiraoka *et al.*, 2001). Estudos realizados por Liu & Xie (2001), com *S. tuberosum*, demonstraram que o aumento no número de células durante a formação do microtubérculo tem maior importância que o aumento no volume celular e que uma temperatura relativamente menor promove a divisão das células, permitindo assim a formação do microtubérculo. Pereira *et al.* (1999) propõem que baixas temperaturas induzem a mobilização de reservas e são responsáveis pelo aumento dos níveis endógenos de giberelinas, melhorando o desenvolvimento da planta. Tais fatores podem explicar o melhor crescimento radicular, da parte aérea e a formação do microtubérculo em *S. allagophylla* crescida em um período com temperatura mais baixa.

#### 4. Transplântio e aclimatação

Na 1ª fase, com as plantas mantidas em câmeras de crescimento, nas mesmas condições do cultivo *in vitro*, houve 100% de sobrevivência em todos os tratamentos. As plantas foram numeradas de 1 a 12, em ordem decrescente de desenvolvimento, tendo-se como critério: presença de microtubérculo, diâmetro médio aproximado do microtubérculo, comprimento e espessura das raízes e caule.

Na 2ª fase, quando foram transplantadas e mantidas em casa de vegetação, a sobrevivência das plantas crescidas nos diferentes tratamentos de temperatura foi:

- T1= 25% sobreviveram e não formaram tubérculos;
- T2= 50% sobreviveram, duas plantas sem o tubérculo e quatro plantas com tubérculo, estes apresentando diferenças no diâmetro;
- T3= 50% sobreviveram, três plantas sem o tubérculo e três com o tubérculo, estes com diâmetro menor que os das plantas crescidas em T2 (tabela 3);
- T4= nenhuma planta sobreviveu.

As plantas que não sobreviveram na 2ª fase do transplântio foram as que não apresentaram, no final da 1ª fase, a formação de microtubérculo e que possuíam raízes e caule menos espessos, com aspecto frágil.

Na 3ª fase, em que foram transplantadas para o vaso, apenas duas plantas do T2 ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$  no claro e  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  no escuro) sobreviveram (planta 1 e 2, da tabela 3), estas foram as que apresentaram maior diâmetro do microtubérculo nas fases anteriores. Resultado semelhante foi obtido em plantas de tumrico, onde apenas as provenientes de microrrizomas maiores se desenvolveram *ex vitro* (Shirgurkar *et al.*, 2001).

Os resultados aqui apresentados indicam que para a sobrevivência *ex vitro* de *S. allagophylla*, é necessária a formação ainda *in vitro* do tubérculo que a espécie apresenta *in natura*. Não apenas a presença, mas também o crescimento favorável deste durante o cultivo

*in vitro*. Provavelmente, a reserva de água, de nutrientes minerais e orgânicos, presentes no microtúbulo, seja o fator limitante para a sobrevivência *ex vitro* da espécie.

**Tabela 1.** Efeito de diferentes concentrações da sacarose sobre o crescimento *in vitro* de *S. allagophylla* (média  $\pm$  desvio padrão). Cultivo por 90 dias, em meio líquido ½ B5, pH 4,6 e fotoperíodo de 16 h. Médias com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas.

Sacarose (g/L)	Comprimento das microplantas (cm)	Número de folhas	Número de raízes *	Comprim. das raízes (cm)	Massa fresca (g)***	Massa seca (g) ***
30	4,5 $\pm$ 1,68 <sup>a</sup>	20,8 $\pm$ 3,63 <sup>a</sup>	7,8 $\pm$ 3,11 <sup>b</sup>	1,94 $\pm$ 0,60 <sup>a</sup>	0,43 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	0,03 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
40	6,2 $\pm$ 1,63 <sup>a</sup>	22,4 $\pm$ 2,60 <sup>a</sup>	11,4 $\pm$ 2,19 <sup>a</sup>	2,46 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	0,73 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,05 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
60	7,0 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup>	20,8 $\pm$ 3,03 <sup>a</sup>	6,4 $\pm$ 2,19 <sup>b</sup>	2,20 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	0,63 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,04 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>

\*\*\*, \*= Diferenças significativas em 0,1% e 5,0% (teste de Duncan)

**Tabela 2.** Efeito de diferentes temperaturas sobre o crescimento *in vitro* de *S. allagophylla* (média  $\pm$  desvio padrão). Cultivo por 90 dias, em meio líquido ½ B5, pH 4,6 e fotoperíodo de 16 h. Médias com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas.

Temperatura	Comprimento das microplantas (cm) <sup>***</sup>	Numero de folhas <sup>***</sup>	Numero de raízes <sup>***</sup>	Comprimento das raízes (cm) <sup>**</sup>
T1 (25 $\pm$ 2°C)	5,6 $\pm$ 1,71 <sup>a</sup>	43,6 $\pm$ 5,77 <sup>b</sup>	8,8 $\pm$ 3,28 <sup>c</sup>	1,85 $\pm$ 0,70 <sup>b</sup>
T2 (25 $\pm$ 2°C e 20 $\pm$ 2°C no escuro)	6,4 $\pm$ 1,78 <sup>a</sup>	57,3 $\pm$ 18,17 <sup>a</sup>	32,9 $\pm$ 8,29 <sup>a</sup>	2,71 $\pm$ 0,72 <sup>a</sup>
T3 (20 $\pm$ 2°C constante)	5,8 $\pm$ 1,85 <sup>a</sup>	39,2 $\pm$ 13,55 <sup>b</sup>	30,3 $\pm$ 7,90 <sup>a</sup>	2,65 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>
T4 (15 $\pm$ 2°C)	3,5 $\pm$ 1,27 <sup>b</sup>	27,8 $\pm$ 8,75 <sup>c</sup>	18,2 $\pm$ 7,66 <sup>b</sup>	2,40 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>

<sup>\*\*\*</sup>, <sup>\*\*</sup>= Diferenças significativas em 0,1% e 1,0% (teste de Duncan)

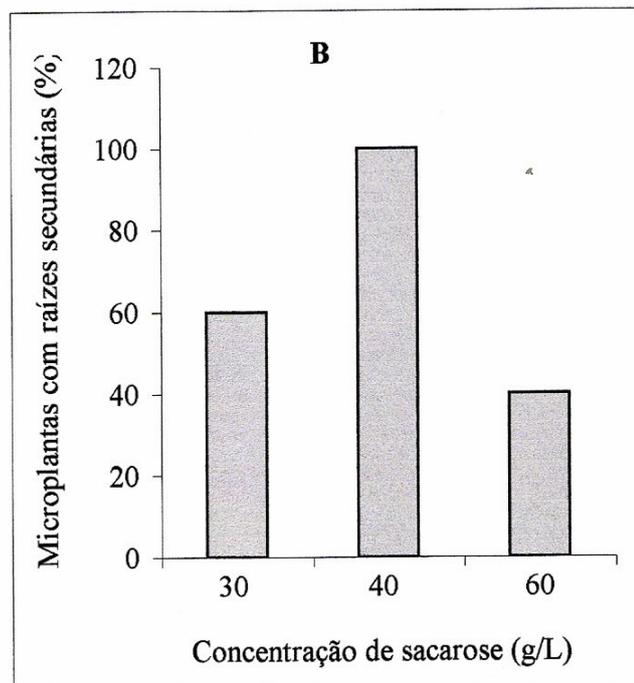
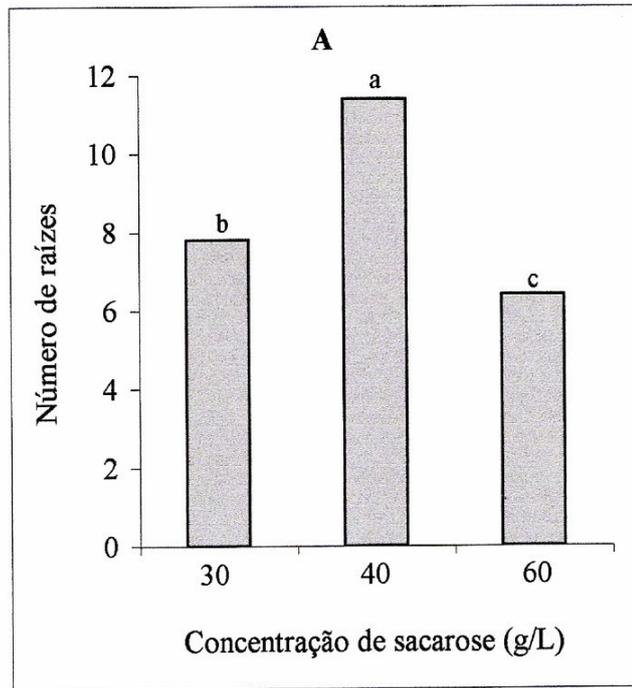
**Tabela 3.** Diâmetro dos microtubérculos de *S. allaghylla* cultivada *in vitro*, no final da 1ª e da 2ª fases do transplantio. Resultado obtido durante a aclimação de microplantas crescidas em diferentes temperaturas (T1= 25 ± 2°C; T2= 25 ± 2°C no claro e 20 ± 2°C no escuro; T3= 20 ± 2°C e T4= 15 ± 2°C), no final do cultivo correspondente à 1ª fase (em frascos com vermiculita e nas condições do cultivo *in vitro*) e à 2ª fase (em vermiculita na casa de vegetação e em condições ambiente) do transplantio.

Planta (nº)	Diâmetro do microtubérculo (mm)							
	1ª Fase				2ª Fase			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
1	-	8,0	6,0	4,0	-	14,0	9,0	x
2	-	7,0	5,0	-	-	12,0	7,0	x
3	-	5,0	5,0	-	x	10,0	6,0	x
4	-	4,0	-	-	-	10,0	-	x
5	-	-	-	-	x	x	-	x
6	-	-	-	-	x	-	x	x
7	-	-	-	-	x	-	-	x
8	-	-	-	-	x	x	x	x
9	-	-	-	-	x	x	x	x
10	-	-	-	-	x	x	x	x
11	-	-	-	-	x	x	x	x
12	-	-	-	-	x	x	x	x

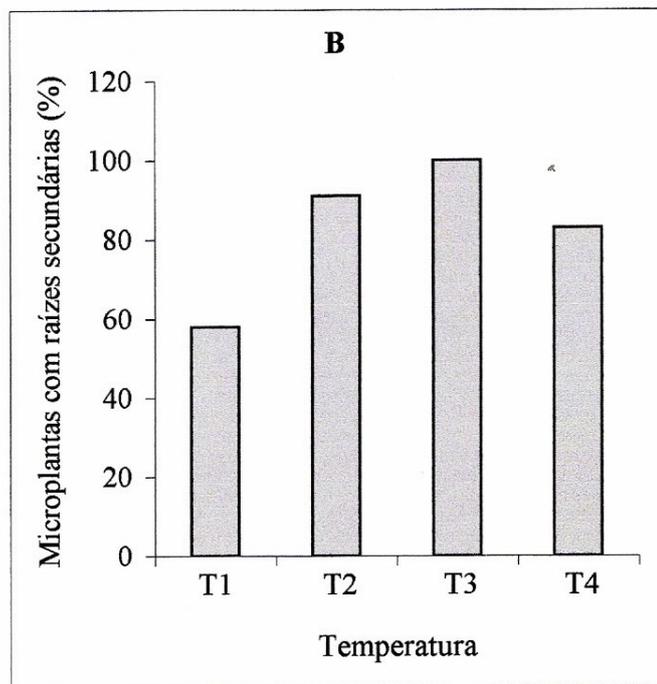
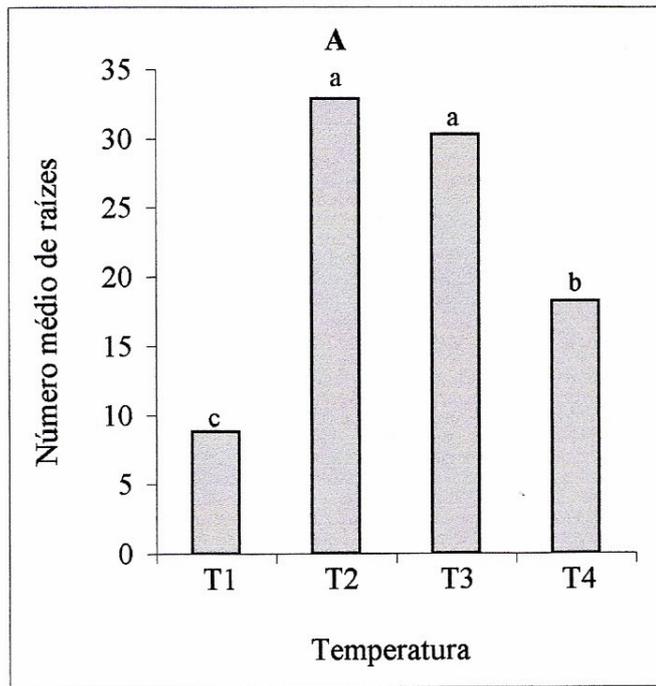
- representa ausência de tubérculo

x representa planta morta eliminada

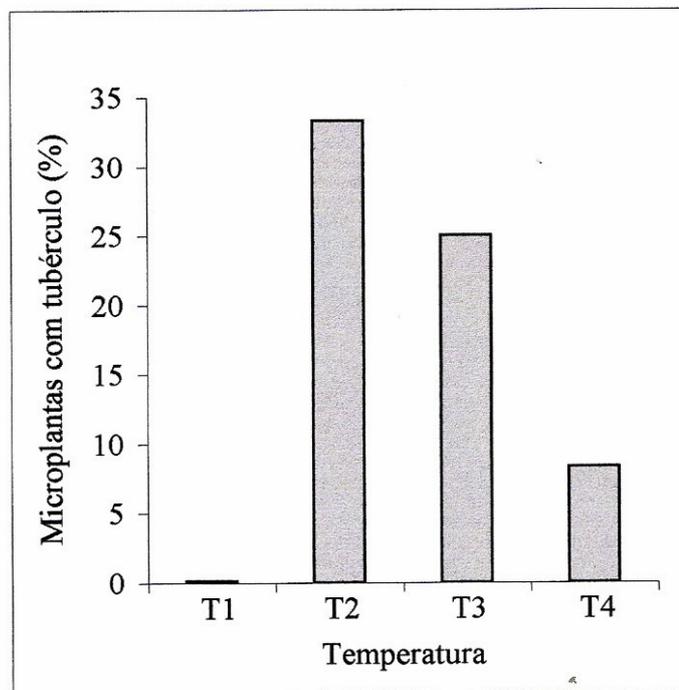
**Figura 2.** Efeito da concentração de sacarose sobre o número médio de raízes (**A**) e na produção de raízes secundárias (**B**) em microplantas de *S. allagophylla*. Cultivo *in vitro* por 90 dias, em meio líquido ½ B5, pH 4,6 e fotoperíodo de 16 h.



**Figura 3.** Efeito de diferentes temperaturas sobre o número médio de raízes (**A**) e na produção de raízes secundárias (**B**) em microplantas de *S. allagophylla*. Cultivo *in vitro* por 90 dias, em meio líquido ½ B5, pH 4,6, fotoperíodo de 16 h e nos tratamentos de temperatura: T1= 25 ± 2°C; T2= 25 ± 2°C no claro e 20 ± 2°C no escuro; T3= 20 ± 2°C e T4= 15 ± 2°C. Em T2 e T3 o número de raízes foi significativamente maior (P= 0,001), bem como o número de microplantas apresentando raízes secundárias (P= 0,038).



**Figura 4.** Efeito de diferentes temperaturas sobre a produção de tubérculo em microplantas de *S. allagophylla*. Cultivo *in vitro* por 90 dias, em meio líquido ½ B5, pH 4,6, fotoperíodo de 16 h e nos tratamentos de temperatura: T1= 25 ± 2°C; T2= 25 ± 2°C no claro e 20 ± 2°C no escuro; T3= 20 ± 2°C e T4= 15 ± 2°C. Em T2 o número de microplantas apresentando tubérculos foi significativamente maior (P= 0,044).



**Figura 5.** Presença do tubérculo e raízes adventícias em microplanta de *S. allagophylla* crescida *in vitro*. Cultivo por 90 dias, em meio líquido ½ B5, suplementado com 40 g/L de sacarose, pH 4,6, temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  no claro e  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  no escuro e fotoperíodo de 16 horas.



Microtubérculo  
com raízes

## **CAPÍTULO 2**

### **Microtuberização em *Sinningia allagophylla***

## RESUMO

O efeito da qualidade do espectro de luz foi testado, em combinação com diferentes concentrações de ANA, na produção de microtubérculos em *Sinningia allagophylla*. Explantes obtidos de plantas cultivadas *in vitro* foram crescidos em meio líquido ½ B5, suplementado com 40 g/L de sacarose; fotoperíodo de 16 h e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  no período de luz e  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  no período de escuro, sendo submetidos a seis tratamentos: (T1) luz fluorescente (F) sem ANA; (T2) mistura de luz fluorescente e incandescente (F + I) sem ANA; (T3) F com 0,005  $\mu\text{g/mL}$  de ANA; (T4) F + I com 0,005  $\mu\text{g/mL}$  de ANA; (T5) F com 0,01  $\mu\text{g/mL}$  de ANA e (T6) F + I com 0,01  $\mu\text{g/mL}$  de ANA. Os tratamentos com ANA induziram a formação de calo na base dos explantes e clorose nas folhas, além de causar diminuição no crescimento da parte aérea e do sistema radicular. A presença da luz incandescente (junto com a fluorescente – F + I), em T2, induziu um número significativamente maior de microtubérculos, bem como o diâmetro destes, em relação ao T1 (apenas com luz fluorescente), não apresentando diferenças nos resultados do crescimento radicular e da parte aérea. A mistura de luz fluorescente com incandescentes, diminuindo a razão da luz vermelha para a luz vermelho extremo, é ideal para a produção de microtubérculos em *S. allagophylla* cultivada *in vitro*, sem a necessidade da presença de regulador de crescimento.

## INTRODUÇÃO

No Cerrado brasileiro cerca de 50% da vegetação herbácea e subarborescente produz órgãos subterrâneos espessados, com diferentes organizações morfo-anatômicas e composições químicas (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 1986). Tais órgãos são importantes como reserva de água, de nutrientes minerais e orgânicos, especialmente de carboidratos; como estrutura de propagação vegetativa e como forma de sobrevivência das espécies nos períodos desfavoráveis de seca ou da ação do fogo (Coutinho, 1990). A maior parte desta vegetação apresenta crescimento estacional, associado com condições ambientais (fotoperíodo, temperatura e umidade relativa do ar) e com as características genéticas da espécie (Rizzini, 1997). Esta periodicidade é caracterizada pela estocagem das reservas, no outono e inverno, e pela despolimerização e mobilização deste material acumulado, durante a retomada de crescimento na primavera e verão (Degaspari *et al.*, 2003).

O órgão subterrâneo de reserva de algumas plantas que crescem no Cerrado tem importância como alimento para o homem, bem como na medicina popular e no comércio de plantas ornamentais (Filgueiras, 2002), com espécies dos gêneros *Manihot* (mandioca), *Dioscorea* (cará) e *Sinningia* sendo exemplos de espécies ameaçadas de extinção, por serem seus tubérculos retirados de populações selvagens para a comercialização, necessitando, assim, de estudos e medidas de preservação (Pereira, 1992; Chautems, 2003). Figueiredo-Ribeiro *et al.* (1986), ao realizarem um levantamento dos compostos de reservas presentes em órgãos subterrâneos de espécies nativas do Cerrado do Estado de São Paulo, detectaram espécies com significativo potencial para a exploração econômica e para o desenvolvimento de estudos fisiológicos e metabólicos, por serem produtoras de altas proporções de carboidratos, dentre elas a espécie *S. allagophylla*.

Estudos com *S. allagophylla*, utilizando o cultivo *in vitro*, permitiram a elaboração de um protocolo de micropropagação, o qual possibilita que mudas homogêneas da espécie fiquem disponíveis o ano todo (Gomes & Shepherd, 2000; Almeida & Shepherd, 1999; Gomes & Shepherd, 2002). Entretanto, em tais estudos não ocorreu a produção *in vitro*, em 100% das microplantas, do tubérculo que a espécie produz *in natura*, o que é importante por aumentar a possibilidade dela sobreviver no campo. Também, o microtubérculo pode ser utilizado como material vegetal para a produção de novas plantas *in vitro* ou *ex vitro*. Microtubérculos apresentam como vantagens: ocupar pouco espaço de armazenamento, dispensar a aclimatação, apresentar maior facilidade de comercialização e diminuir o número de gerações necessárias para a multiplicação no campo (Mantell & Hugo, 1989; Rodrigues-Otubo *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2000; Islam *et al.*, 2004).

A microtuberização é considerada um processo complexo, controlado por uma série de fatores que vêm sendo investigados: sacarose, reguladores de crescimento, concentrações de nutrientes do meio de cultura, fotoperíodo, quantidade e qualidade da luz, temperatura, a espécie e o explante. É difícil estabelecer a resposta exata para um determinado fator e, provavelmente, esta seja dependente de interações dos fatores citados.

A sacarose é o estímulo mais crítico para a formação de microtubérculos. É essencial no cultivo *in vitro* por seu efeito osmótico (Khuri & Moorby, 1995), como fonte de energia e, em maiores concentrações, pode ter um papel de sinal indutor para a formação de microtubérculo (Perl *et al.*, 1991; Simko, 1994). Uma concentração de 80 g/L é geralmente cogitada como essencial para a rápida indução e o desenvolvimento de microtubérculos, como observado em *Solanum tuberosum* (Garner & Blake, 1989; Khuri & Moorby, 1995; Bizarri *et al.*, 1995; Rodrigues-Otubo *et al.*, 1999; Alix *et al.*, 2001), em *Dioscorea rotundata* (Ng, 1988), em *Dioscorea composita* (Mantel & Hugo, 1989; Alizadeh *et al.*, 1998), em *Helianthus tuberosus* (Gamburg *et al.*, 1999) e em *Ipea malabarica* (Martin, 2003). Já nas espécies do gênero

*Ceropegia*, a concentração ótima de sacarose foi de 40 g/L e tanto o aumento quanto a diminuição desta concentração inibiu a microtuberização (Patil, 1998).

Há considerável variação na resposta para os reguladores de crescimento, além disso, foi demonstrada a indução de microtubérculos mesmo na ausência deles (Garner & Blake, 1989; Charles & Rossignol, 1992; John *et al.*, 1993; Ranalli *et al.*, 1994; Gopal *et al.*, 1998; Kim & Jang, 2004). O uso de meio com ausência de reguladores de crescimento é desejável, quando o objetivo é a exploração da capacidade dos genótipos em produzir microtubérculos e para remover a possibilidade de algum efeito indesejável que possam causar.

Os reguladores de crescimento ANA e ABA estimularam a microtuberização de diferentes espécies do gênero *Dioscorea* (John *et al.*, 1993; Alizadeh *et al.*, 1998). ANA induziu microrrizomas em *Curcuma longa* (Islam *et al.*, 2004) e em *Geodorum densiflorum* (Sheelavantmath *et al.*, 2000), bem como microbulbos em *Lillium speciosum* (Chang *et al.*, 2000). Em *S. tuberosum*, BA aumentou o número de microtubérculos (Banfalvi *et al.*, 1997; Rodrigues-Otubo *et al.*, 1999; Al-Safadi *et al.*, 2000; Gopal *et al.*, 2004), enquanto ABA e AIA estimularam o crescimento destes (Abdullah & Ahmad, 1980; Menzel, 1980; Marschner *et al.*, 1984; Xu *et al.*, 1998; Romanov *et al.*, 2000).

A luz é outro importante fator considerado na microtuberização, com o período de luz, a sua intensidade e qualidade tendo efeito significativo na produção de órgãos de reserva. O fotoperíodo curto, de 8 e 10 horas, foi o mais efetivo na microtuberização em *S. tuberosum* (Garner & Blake, 1989; Charles & Rossignol, 1992; Bizarri *et al.*, 1995; Gopal *et al.*, 1998), em *Gomphrena macrocephala* (Moreira *et al.*, 1999), em *Dioscorea bulbifera* (Mantell & Hugo, 1989) e em *Curcuma aromatica* (Nayak, 2000). Já em *D. rotundata*, fotoperíodos longos, de 12 e 16 horas de luz foi o ideal (Ng, 1988) e em *Zingiber officinale* a melhor produção de microrrizomas foi em luz contínua (fotoperíodo de 24 horas) (Rout *et al.*, 2001).

Intensidades luminosas mais altas, entre 42 e 100  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , têm sido usadas nos diversos estudos acima citados, elevando o número total do órgão de reserva nos explantes. Quanto à qualidade espectral da luz, uma taxa de baixo espectro na luz vermelha (V) para a luz no vermelho extremo (Ve) foi necessária para induzir a microbulbificação em *Allium cepa* (Kahane *et al.*, 1992; Kahane *et al.*, 2001; Le Guen-Le Saos *et al.*, 2002) e a microtuberização de *S. tuberosum* (Charles & Rossignol, 1992; Alix *et al.*, 2001). Baixa proporção de V:Ve é obtida utilizando-se uma mistura de luz fluorescente branca (que contém V) com luz incandescente (que contém tanto V como Ve) (Thomas & Vince-Prue, 1997).

Quanto à temperatura, foi observado que temperatura baixa (menor que 20°C) tem efeito promotor na microtuberização de *S. tuberosum* (Gopal *et al.*, 1998; Liu & Xie, 2001), de *H. tuberosus* (Gamburg *et al.*, 1999) e de *Corydalis ambigua* (Hiraoka *et al.*, 2001).

Um outro fator considerado é o meio de cultura, com o meio MS, com sua composição total ou diluída, sendo efetivo e bastante utilizado. O uso do meio na forma líquida vem sendo proposto, com resultados satisfatórios, induzindo maior número de microtubérculos e estes com peso maior, em espécies do gênero *Chlorophytum* (Suri *et al.*, 1999) e em *S. tuberosum* (Jiménez *et al.*, 1999).

A formação *in vitro* de órgãos de reserva tem sido enfocada para diferentes espécies, como as acima citadas, entretanto, são poucos os estudos relatados com espécies endêmicas do bioma Cerrado, sendo estes importantes, pois, como já foi dito, 50% da vegetação herbácea do Cerrado produz o órgão de reserva subterrâneo, com muitas espécies tendo grande importância ecológica e econômica.

O objetivo do presente trabalho foi o de obter condições de cultivo *in vitro* que induzam a formação de microtubérculos em explantes de *S. allagophylla*, obtendo-se mudas homogêneas com os padrões morfológicos e fisiológicos que a espécie apresenta *in natura*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Plantas cultivadas *in vitro* no Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp, obtidas a partir de sementes coletadas de plantas crescidas em Campo Cerrado, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu, no estado de São Paulo, foram utilizadas para a obtenção de explantes. Estes consistiram de segmentos nodais, da região mediana do caule, com aproximadamente 0,8 cm de comprimento e com um par de folhas.

Os explantes foram cultivados em câmara de crescimento Forma Scientific, com fotoperíodo de 16 horas de luz, intensidade luminosa de  $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  no período de luz e  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  no período de escuro. O meio de cultivo utilizado foi o meio líquido ½ B5, suplementado com 40 g/L de sacarose, pH ajustado para 4,6 com HCl e NaOH e autoclavado em temperatura de  $121^\circ\text{C}$ , por 20 minutos. O período de cultivo foi de 120 dias, sendo 60 dias em tubo de ensaio com 8 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro e, os 60 dias restantes, em tubos de ensaio de 15 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, com renovação do meio. Como suporte foi usado papel filtro Whatman nº 1.

O efeito da qualidade do espectro de luz foi testado em combinação com o efeito de diferentes concentrações de ANA, diferindo em seis tratamentos, com doze repetições. Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3: 2 tratamentos com diferentes fontes de luz – fluorescente (F) e mistura de fluorescente e incandescente (F + I) – e 3 tratamentos com diferentes concentrações de ANA (tabela 1).

Luz foi fornecida por cinco tubos de lâmpadas fluorescentes branca-frias de 40 W da Sylvania (1214 mm), para os tratamentos com luz fluorescente; ou por quatro tubos de lâmpadas fluorescentes branca-frias de 40 W e uma lâmpada incandescente de 120 W da Osram, para os tratamentos com a mistura de F + I.

**Tabela 1.** Combinações de diferentes concentrações de ANA com diferentes tratamentos de luz

	ANA ( $\mu\text{g/mL}$ )		
Luz	0,0	0,005	0,01
F	T1	T3	T5
F + I	T2	T4	T6

F= luz fluorescente; F + I= mistura de luz fluorescente com incandescente

Além da produção de microtubérculos e o diâmetro destes, foram analisadas as características: comprimento da microplanta, número de folhas, número de raízes, o maior comprimento médio das raízes, presença de raízes secundárias, presença de calo, clorose das folhas, massa fresca e massa seca das microplantas inteiras. Análises dos dados foram realizadas utilizando programa ANOVA, por meio de comparação de médias pelo teste de Duncan, exceto para a produção de microtubérculos e de raízes secundárias, com os dados tendo sido analisados utilizando-se o *software* SAS (Statistical Analysis System) (SAS Institute, 1986).

O regulador de crescimento ANA foi testado porque em um experimento preliminar, com o cultivo *in vitro* de *S. allagophylla* em meio suplementado com ANA, este teve um certo efeito na formação de microtubérculos. O cultivo em um período de 120 dias, concentração de 40 g/L de sacarose no meio, temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  no período de luz e  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  no período de escuro e intensidade luminosa de  $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , foram as condições utilizadas nos experimentos por terem sido as encontradas, em estudos anteriores, como sendo as favoráveis para a produção de microtubérculos e maior diâmetro destes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença da auxina ANA no meio de cultivo, mesmo em concentração bastante reduzida (0,005 µg/mL), induziu a formação de calo em uma média de 10% das microplantas em cada tratamento, bem como de clorose nas folhas, em uma média de 15% de folhas das microplantas. Também apresentou um efeito inibitório na formação do microtubérculo e do sistema radicular (tabela 2 e figuras 2 e 3). O mesmo foi observado na microtuberização de *Dioscorea alata* (John *et al.*, 1993) e na microbulbificação de várias espécies de lírios crescidos na Coreia (Jeong, 1996).

O efeito tóxico de ANA exógeno sobre o desenvolvimento da planta foi significativamente maior em T6 (P= 0,0001 para a produção de raízes secundárias e de microtubérculos e P= 0,001 para os demais parâmetros), quando a luz incandescente estava presente (F + I). Isto pode ser explicado por uma provável interação existente entre a qualidade da luz e o regulador de crescimento na resposta da planta, com a diminuição da proporção da luz vermelha (V) para o vermelho extremo (Ve), obtida com a combinação F + I, elevando o uso de ANA pela planta. Estudos realizados por Herrington & McPherson (1993) com *Spiraea nipponica* (Rosaceae) revelaram que a mistura de luz V e Ve, fornecida por F + I, tornou a planta mais eficiente em utilizar o BA suplementado no meio de cultura, diminuindo o requerimento de maiores concentrações exógenas deste para o desenvolvimento eficaz da planta *in vitro*. O mesmo foi observado em plântulas de milho para AIA (Lino, 1982).

Os tratamentos T1 e T2, sem a presença de ANA, foram favoráveis à produção de microtubérculo, tendo sido encontrado, respectivamente, em 80% e 90% das microplantas (figura 2A). Houve um aumento significativo no diâmetro médio dos microtubérculos quando os explantes foram cultivados sob a mistura de luz F + I, em T2 (figuras 1 e 2B), não ocorrendo diferenças de respostas, entre T1 e T2, para as demais características analisadas, ou

seja, a luz incandescente suplementar não apresentou efeito morfológico sobre o desenvolvimento radicular e da parte aérea. A indução do crescimento dos microtubérculos pode ser resultante de um efeito dado pela maior taxa de luz  $V_e$ , fornecida pela lâmpada incandescente, sobre a distribuição de reservas da planta, com o dreno de assimilados pelos microtubérculos. Em plantas de alho (Kahane *et al.*, 2001) e batata (Alix *et al.*, 2001) cultivadas *in vitro*, a menor proporção espectral de  $V:V_e$  (obtida por  $F + I$ ) promoveu maior dreno de carboidratos, com maior armazenagem destes nos órgão de reserva (microbulbo e microtubérculo, respectivamente), comparado ao cultivo em luz fluorescente. Também, a aplicação conjunta de luz no  $V$  e no  $V_e$  pode elevar a taxa fotossintética, em comparação ao uso apenas da luz no  $V$ , dada pela lâmpada fluorescente (Taiz & Zeiger, 2004).

A massa fresca e a massa seca das microplantas inteiras de cada tratamento foram significativamente maiores em T2 (tabela 3), provavelmente devido ao maior número e maior diâmetro dos microtubérculos obtidos neste tratamento.

A resposta dada por *S. allagophylla* à qualidade da luz, indica o envolvimento de fitocromo na sua microtuberização, como também foi relatado na produção *in vitro* de bulbo em *Allium cepa* (Le Guen-Le Saos *et al.*, 2002) e de tubérculo em *Dioscorea alata* (John *et al.*, 1993) e *Solanum tuberosum* (Jackson *et al.*, 1998; Martínez-García *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos nos tratamentos com ANA estão em concordância com os resultados de estudos anteriores com *S. allagophylla*, em que a presença de reguladores de crescimento, no meio de cultivo *in vitro*, induziu à formação de calo e de clorose nas plantas (Gomes & Shepherd, 2002), indicando que os níveis endógenos destes nos explantes são satisfatórios.

**Figura 1.** *S. allagophylla* crescida em meio sem a presença de ANA e sob a mistura de luz fluorescente com incandescente (F + I). Cultivo em um período de 120 dias, em meio líquido ½ B5, com 40 g/L de sacarose, pH 4,6, fotoperíodo de 16 h e no tratamento T2, onde ocorreu a maior produção de microtubérculo.



**Tabela 2.** Efeito da luz fluorescente (F) ou fluorescente + incandescente (F + I) e da concentração de ANA sobre o crescimento *in vitro* de *S. allagophylla* (média  $\pm$  desvio padrão). Cultivo em um período de 120 dias, em meio líquido ½ B5, com 40 g/L de sacarose, pH 4,6 e fotoperíodo de 16h. Médias com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas.

Tratamento		Compr/to das microplantas (cm)**	Número de folhas***	Número de raízes***	Compr/to das raízes (cm)***	Diâmetro do micro-tubérculo (mm)***
Sem ANA	F (T1)	10,6 $\pm$ 2,64 <sup>a</sup>	47,8 $\pm$ 11,36 <sup>a</sup>	13,8 $\pm$ 5,93 <sup>a</sup>	4,0 $\pm$ 1,27 <sup>a</sup>	7,2 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>
	F + I (T2)	10,8 $\pm$ 2,48 <sup>a</sup>	45,6 $\pm$ 14,39 <sup>a</sup>	13,2 $\pm$ 5,42 <sup>a</sup>	3,8 $\pm$ 1,24 <sup>a</sup>	8,6 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>
ANA 0,05 $\mu$ g/mL	F (T3)	11,2 $\pm$ 2,55 <sup>a</sup>	49,3 $\pm$ 9,85 <sup>a</sup>	8,2 $\pm$ 3,05 <sup>b</sup>	2,3 $\pm$ 1,30 <sup>b</sup>	7,2 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>
	F + I (T4)	11,1 $\pm$ 2,25 <sup>a</sup>	44,3 $\pm$ 11,90 <sup>a</sup>	7,6 $\pm$ 2,70 <sup>bc</sup>	2,1 $\pm$ 0,91 <sup>b</sup>	7,6 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>
ANA 0,1 $\mu$ g/mL	F (T5)	11,4 $\pm$ 2,67 <sup>a</sup>	49,6 $\pm$ 13,69 <sup>a</sup>	8,1 $\pm$ 3,27 <sup>b</sup>	2,3 $\pm$ 1,19 <sup>b</sup>	6,3 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup>
	F + I (T6)	7,63 $\pm$ 1,88 <sup>b</sup>	26,3 $\pm$ 6,26 <sup>b</sup>	4,7 $\pm$ 1,61 <sup>c</sup>	1,0 $\pm$ 0,49 <sup>c</sup>	6,1 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup>

\*\*\*, \*\*= Diferenças significativas em 0,1% e 1,0% (teste de Duncan)

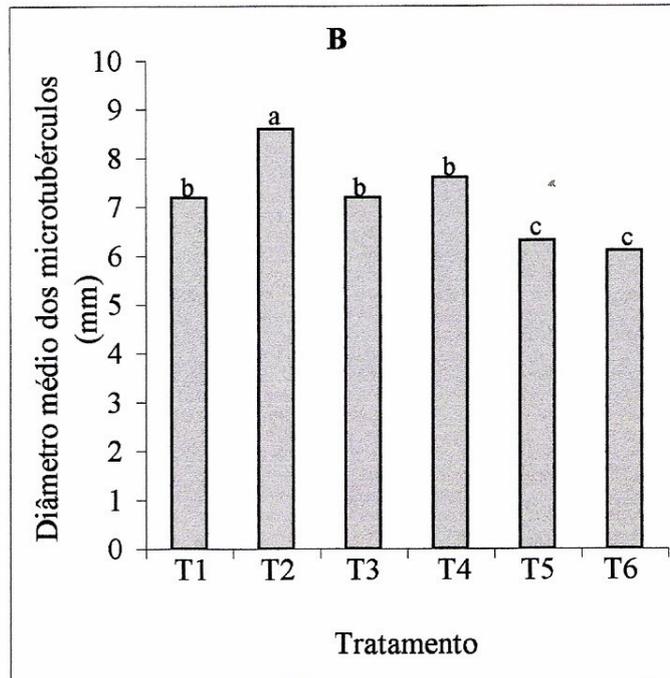
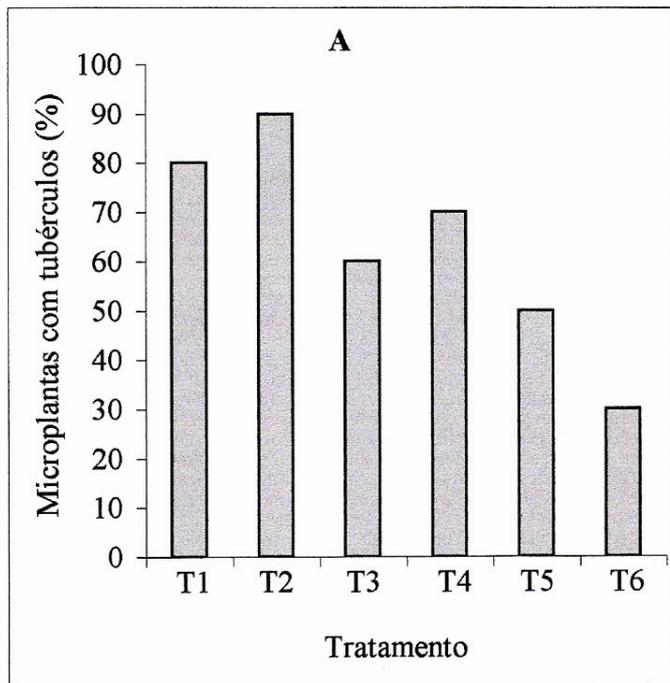
**Tabela 3.** Efeito da luz fluorescente (F) ou fluorescente + incandescente (F + I) e da concentração de ANA sobre a massa fresca e massa seca da microplanta inteira de *S. allagophylla* cultivada *in vitro* (média  $\pm$  desvio padrão). Cultivo em um período de 120 dias, em meio líquido ½ B5, com 40 g/L de sacarose, pH 4,6 e fotoperíodo de 16h. Médias com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas.

	Tratamento					
	Sem ANA		ANA 0,05 $\mu$ g/mL		ANA 0,1 $\mu$ g/mL	
	F (T1)	F + I (T2)	F (T3)	F + I (T4)	F (T5)	F + I (T6)
Massa fresca (g) <sup>***</sup>	1,32 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	1,43 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	1,27 $\pm$ 0,09 <sup>bc</sup>	1,28 $\pm$ 0,10 <sup>bc</sup>	1,23 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>	0,79 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>
Massa seca (g) <sup>***</sup>	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,08 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,08 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>

<sup>\*\*\*</sup>= Diferenças significativas em 0,1% (teste de Duncan)

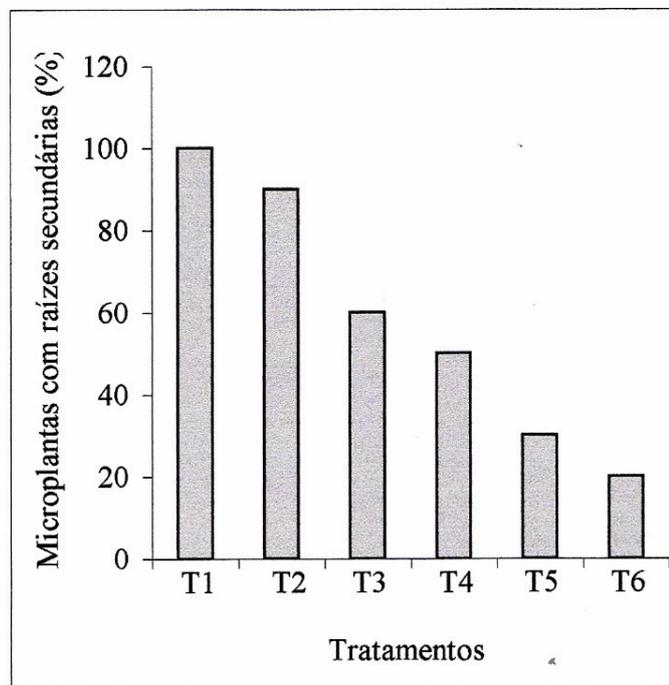
**Figura 2.** Efeito da luz fluorescente (F) ou fluorescente + incandescente (F + I) e da concentração de ANA sobre a produção (A) e sobre o diâmetro médio (B) dos microtubérculos em *S. allagophylla*. Cultivo *in vitro* por um período de 120 dias, em meio líquido ½ B5, pH 4,6 e fotoperíodo de 16 h. O número de microplantas com tubérculo foi significativamente menor com ANA no meio de cultivo (P= 0,0001) e o diâmetro médio dos microtubérculos foi significativamente maior em T2 (P= 0,001).

T1= F; T2= F+I; T3= F + ANA 0,05 µg/mL; T4= (F+I) + ANA 0,05 µg/mL; T5= F + ANA 0,1 µg/mL; T6= (F+I) + ANA 0,1 µg/mL.



**Figura 3.** Efeito da luz fluorescente (F) ou fluorescente + incandescente (F + I) e da concentração de ANA sobre a produção de raízes secundárias em *S. allagophylla*. Cultivo *in vitro* por um período de 120 dias, em meio líquido ½ B5, pH 4,6 e fotoperíodo de 16 h. O número de microplantas com raízes secundárias foi significativamente menor com ANA no meio de cultivo ( $P < 0,0001$ )

T1= F; T2= F+I; T3= F + ANA 0,05 µg/mL; T4= (F+I) + ANA 0,05 µg/mL; T5= F + ANA 0,1 µg/mL; T6= (F+I) + ANA 0,1 µg/mL.



## **CAPÍTULO 3**

**Efeitos do alumínio no crescimento e na composição mineral de  
microplantas de *S. allagophylla* cultivada *in vitro***

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes níveis de alumínio no crescimento e na aquisição de nutrientes por *Sinningia allagophylla*, sob cultivo *in vitro*. Explantes foram crescidos em meio líquido ½ B5 modificado, com as concentrações reduzidas dos sais de cálcio e fósforo, ferro não quelatado, pH 4,0 e suplementado com diferentes concentrações de alumínio. Os tratamentos aplicados foram: (T1) meio sem alumínio e com 0,01mM de fosfato; (T2) meio sem alumínio e com 0,02 mM de fosfato; (T3) meio com 50µM de  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$  e 0,01 mM de fosfato; (T4) meio com 50 µM de  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$  e 0,02 mM de fosfato; (T5) meio com 100 µM de  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$  e 0,01 mM de fosfato; (T6) meio com 100µM de  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$  e 0,02 mM de fosfato; (T7) meio com 200 µM de  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$  e 0,01 mM de fosfato; (T8) meio com 200 µM de  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$  e 0,02mM de fosfato. Análises químicas da parte aérea das microplantas foram realizadas no final do cultivo (120 dias), obtendo-se os teores dos nutrientes nestas. Após 60 dias de cultivo, nos tratamentos com maiores concentrações de Al (T7 e T8) ocorreu queda no valor do pH do meio e o aparecimento de necrose nas raízes, clorose nas folhas e interrupção no crescimento das microplantas, sendo estas eliminadas do experimento. O valor do pH nos demais tratamentos não se alterou e após 120 dias de cultivo não foram observados efeitos tóxicos nas microplantas, ao contrário, no tratamento T5 os microtubérculos apresentaram diâmetro significativamente maior e houve uma tendência para maior desenvolvimento radicular. Os resultados das análises químicas não apontaram deficiências de nutrientes e indicaram que *S. allagophylla* é uma acumuladora de alumínio (com mais de 1000mg/kg) e de manganês (com mais de 300 mg/kg), apresentando um aumento nos níveis, tanto de alumínio como de manganês, em sua parte aérea, com a elevação da concentração de alumínio no meio. Os resultados indicaram tratar-se de uma espécie com estratégias para crescer sob as condições dos solos do Cerrado.

## INTRODUÇÃO

Vários estudos indicam que as propriedades do solo, função de sua origem geológica, são determinantes das fisionomias vegetais encontradas no bioma Cerrado (Malavolta & Kliemann, 1985; Lüttge, 1997; Ruggiero *et al.*, 2002). A vegetação do Cerrado cresce geralmente em solos ácidos, bem drenados, profundos, com deficiências minerais e com altos teores de alumínio e manganês (Eiten, 1994). Estas condições fazem com que tais solos sejam impróprios para o cultivo da maior parte das espécies de plantas, sobretudo pela presença de alumínio solúvel (Malavolta & Kliemann, 1985; Ritchie, 1994).

A fitotoxicidade do alumínio é um fenômeno complexo e ainda não totalmente esclarecido. Acredita-se que os danos causados pelo íon alumínio sejam dependentes do tempo de exposição e da concentração do íon; da composição iônica do substrato; da temperatura; da espécie; do genótipo e da idade da planta (Rengel, 1992; Macedo *et al.*, 1997). O conhecimento que se tem atualmente dos efeitos tóxicos do alumínio sobre as plantas está descrito em várias revisões e novos artigos estão constantemente sendo publicados (Fagéria *et al.*, 1988; Furlani, 1989; Taylor, 1995; Kochian, 1995; Lüttge, 1997; Matsumoto, 2000; Osawa & Matsumoto, 2001; Mossor-Pietraszewska, 2001; Jansen *et al.*, 2002; Čiamporová, 2002; Samac & Tesfaye, 2003; Sivaguru *et al.*, 2005).

Os diferentes relatos apontam a rápida inibição do crescimento da raiz como a principal expressão da toxicidade do alumínio, sendo o alvo as células da porção distal da zona de transição do ápice da raiz, interferindo no alongamento e na divisão das células. Os mecanismos normalmente citados são: (1) aumento da rigidez da parede celular, por se ligar com pectinas ou proteínas da parede, o que pode levar a uma diminuição na sua extensibilidade; (2) redução da replicação do DNA, por aumentar a rigidez da dupla-hélice; (3) fixação do fósforo em forma pouco solúvel na solução do solo, reduzindo a sua

disponibilidade pela planta; (4) interferência na ação de algumas enzimas; (5) diminuição na deposição de polissacarídeos da parede celular; (6) diminuição na produção e no transporte de citocininas e auxinas; (8) modificação na estrutura e na função da membrana plasmática, com a despolarização da membrana, bloqueio de canais e diminuição da permeabilidade; (9) alteração na estrutura e função do citoesqueleto; (10) formação de calose no plasmodesma que interfere com a comunicação intercelular; (11) redução na absorção de água e (12) intervenção na absorção, transporte e metabolismo de vários nutrientes essenciais, em especial dos cátions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ .

Estágios posteriores da toxicidade do alumínio estão associados com a peroxidação de lipídios (Yamamoto *et al.*, 2001) e repressão da atividade mitocondrial, com a inibição da respiração, exaustão de ATP e produção de oxigênios reativos (Yamamoto *et al.*, 2002).

Embora vários mecanismos de tolerância ao alumínio pelas plantas tenham sido propostos, estudos têm repetidamente demonstrado que ácidos orgânicos, com capacidade de quelatar o alumínio, possuem um importante papel na detoxicação do alumínio, neutralizando-o internamente e externamente (Ma, 2000; Ma *et al.*, 2001). O principal ânion orgânico liberado em resposta ao alumínio é o malato em *Triticum aestivum* (Delhaize *et al.*, 1993; Ahn *et al.*, 2004); o citrato em *Zea mays* (Miyasaka *et al.*, 1991), em *Cassia tora* (Ma *et al.*, 1997b) e em *Glycine max* (Silva *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2004); citrato e malato em mutantes de *Arabidopsis* (Larsen *et al.*, 1998) e em triticale (Ma *et al.*, 2000); e oxalato em *Fagopyrum esculentum* (Ma & Hiradate, 2000)

Outros processos de detoxicação do alumínio incluem: (1) aumento da secreção de mucilagem pela raiz, formando uma camada limite que diminui a difusão do alumínio para as células da raiz (Li *et al.*, 2000); (2) exclusão do fosfato da raiz, precipitando o alumínio presente na solução do solo (Pellet *et al.*, 1997); (3) exclusão do alumínio por ligação com polipeptídios secretados (Basu *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2002); (4)

alcalinização da rizosfera, pelo influxo de  $H^+$  nas pontas das raízes (Degenhardt *et al.*, 1998) ou através da preferência pela planta por nitrato em relação ao amônio (Taylor, 1995), resultando em uma redução nos teores de alumínio solúvel e uma mudança para um tipo solúvel menos tóxico; (5) fixação do alumínio na parede celular e permeabilidade seletiva da membrana plasmática, impedindo o movimento do alumínio no simplasma (Taylor *et al.*, 2000; Mossor-Pietraszewska, 2001) e (6) redistribuição do alumínio acumulado em tecidos sensíveis por uma proteína transportadora (Larsen, 2005), ficando a maior parte do alumínio acumulado nas células epidérmicas e corticais do ápice da raiz (Delhaize *et al.*, 1993; Jansen *et al.*, 2002).

É também conhecido que algumas espécies de plantas acumulam alumínio em altas concentrações na parte aérea, principalmente nas folhas, sem apresentar algum sinal de toxicidade. Uma espécie é considerada acumuladora de alumínio quando apresenta um conteúdo médio de mais de 1000 mg/kg de massa seca das folhas, sendo o conteúdo médio encontrado nas não acumuladoras de aproximadamente 200 mg/kg (Jansen *et al.*, 2002). De acordo com Jansen *et al.* (2002) as espécies acumuladoras estão distribuídas em aproximadamente 45 famílias, como em Cunnoniaceae, Monimiaceae, Proteaceae, Rapateaceae, Rubiaceae e Vochysiaceae. São exemplos: *Camellia sinensis*, acumulando acima de 30000 mg/kg (Matsumoto *et al.*, 1976), *Hydrangea*, com mais de 3000mg/kg (Ma *et al.*, 1997a); *Miconia acinodendron* e *Symplocos spicata*, com 66100 mg/kg e 72300 mg/kg, respectivamente (Osaki *et al.*, 1997). Masunanga *et al.* (1998), identificaram 65 espécies de árvores, em florestas tropicais da Indonésia, como acumuladoras de alumínio e Haridasan (1982) listou níveis de alumínio entre 4000 e 14000 mg/kg para várias espécies crescidas no Cerrado do Brasil Central. Algumas famílias, incluindo a Vochysiaceae, são acumuladoras obrigatórias de alumínio e não podem viver na sua ausência (Oliveira-Filho & Ratter, 2002).

Estudos anteriores, com plantas crescidas em área de Campo Cerrado, da Reserva Biológica de Moji Guaçu (SP), mostraram que *S. allagophylla*, herbácea da família Gesneriaceae, de ampla distribuição nos cerrados, é uma espécie acumuladora de alumínio (com 2991,9 mg/kg de peso seco das folhas), adaptada a solos ácidos, com teores baixos de nutrientes e altos de alumínio trocável (Gomes & Shepherd, 2000).

A alta concentração de alumínio na parte aérea sugere que plantas acumuladoras de alumínio possuem um sistema de absorção e translocação do alumínio, ausente nas não acumuladoras. Tem sido proposto a complexação do alumínio por ácidos orgânicos, proteínas, ou outros ligantes orgânicos, permitindo a sua translocação das raízes para a parte aérea e acumulação nas folhas, sendo que o complexo alumínio-ligante para a translocação freqüentemente difere daquele armazenado nas folhas (Watanabe & Osaki, 2002).

Estudos realizados por Ma & Hiradate (2000) e Shen *et al.* (2002), com a espécie acumuladora *F. esculentum*, mostraram que o alumínio é absorvido pelas raízes na forma de  $Al^{3+}$  e, em seguida, é quelatado com o oxalato presente nas células das raízes, formando um complexo estável, não tóxico. Quando o alumínio é translocado via xilema, para as folhas, deixa de ser quelatado pelo oxalato e passa a se ligar ao citrato e, nos tecidos das folhas, novamente passa a se ligar ao oxalato, sendo desta forma seqüestrado para o vacúolo. Resultados de tais estudos também induziram à hipótese de que a absorção do alumínio nas raízes é um processo passivo, mediado por um canal ou transportador, provavelmente uma proteína, com o íon  $Al^{3+}$  passando através da membrana plasmática ao longo de um gradiente de concentração.

Tem sido freqüentemente relatado que concentrações excessivas de alumínio na planta reduz a absorção de nutrientes essenciais, como o cálcio, fósforo, manganês, zinco e ferro. Entretanto, Haridasan (1982) observou que as espécies acumuladoras de alumínio não apresentaram absorção reduzida de tais elementos. Além disso, alguns estudos têm

demonstrado que o alumínio eleva o crescimento de algumas espécies, como em *Miconia albicans* (Haridasan, 1988); *Hydrangea* (Ma *et al.*, 1997a); *Camellia* (Konishi *et al.*, 1985), *Melastoma malabathricum* (Watanabe *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 2005) e em *Betula pendula* (Kidd & Proctor, 2000).

A hipótese dada para esta elevação no crescimento é a de um aumento na absorção e utilização dos nutrientes pela planta, resultantes da presença de altos níveis de alumínio nos tecidos da planta, ou da interação do alumínio com um elemento particular, como ferro e fósforo (Osaki *et al.*, 1997; Watanabe & Osaki, 2002; Watanabe *et al.*, 2005). Ruggiero *et al.* (2002), estudando espécies do Cerrado do Sudeste do Brasil, concluíram que o processo de acumulação de alumínio é parte de um mecanismo fisiológico da planta para melhorar a absorção de nutrientes e não como uma resposta de sua toxicidade. Explicaram que as plantas ao retirarem o alumínio do solo, fixando-o em tecidos específicos das folhas, permitem que os nutrientes fiquem mais disponíveis.

Há também evidências que o efeito benéfico do alumínio no crescimento seja resultante da diminuição da toxicidade do próton ( $H^+$ ) pelo íon  $Al^{3+}$ , com o  $Al^{3+}$  aumentando a polaridade elétrica da membrana celular e estimulando a extrusão do  $H^+$  (Llugany *et al.*, 1995; Kinraide, 2003). Como efeitos benéficos ecológicos, tem sido proposto que as plantas acumulam alumínio como uma estratégia de defesa contra herbívoros e patógenos (Ernst *et al.*, 1990; Ghaderian *et al.*, 2000; Pollard, 2000; Wilfried, 2000; Jiang, 2005).

Atualmente, a abordagem mais utilizada em pesquisas com o alumínio é a obtenção de genótipos tolerantes, visando o desenvolvimento de cultivares mais produtivas em solos ácidos e com altos teores de alumínio. Para tanto, espécies ou variedades são selecionadas através do cultivo em solução nutriente, pela hidroponia (Camargo & Ferreira-Filho, 1999; Kidd & Proctor, 2000; Mistro *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001), ou pelo cultivo *in vitro* de células ou raízes (Conner & Meredith, 1985a; Karsai & Bedö, 1998; Basu *et al.* 1999; Ramgareeb *et al.*,

1999; Dantas *et al.*, 2001). Também, a seleção através da identificação e produção de variações somaclonais, utilizando-se técnicas de cultivo de tecidos (Meredith, 1978; Van Sint Jan *et al.*, 1997; Espino *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 2000; Salomon, 2003; Samac & Tasfaye, 2003). Estudos da acumulação de alumínio em espécies nativas, que crescem em solos ácidos, podem oferecer um melhor entendimento do mecanismo de resistência e adaptação, bem como permitir, através de um planejamento sustentado, o cultivo de tais espécies, visando tanto o aspecto econômico (cultivo daquelas com importância na alimentação do homem, na medicina, como ornamentais, entre outras), como o de reflorestamento.

Para aumentar a eficácia da técnica *in vitro*, propõe-se que as condições ambientais devem ser investigadas no cultivo, simulando a expressão fenotípica encontrada nas condições *in natura*, entretanto, a tolerância ao estresse abiótico frequentemente não tem sido avaliada *in vitro*. Quanto à tolerância ao alumínio, não há estudos *in vitro* com espécies nativas acumuladoras, com a elaboração de um protocolo baseado nas condições do meio a que a espécie está sujeita. Além disso, avaliações *in natura* da assimilação de nutrientes por tais espécies, crescendo em solos com altos teores de alumínio solúvel, foram descritas apenas por Haridasan (1982; 2000). Assim sendo, a finalidade do presente trabalho foi a de obter informações a respeito do efeito de diferentes níveis de alumínio no acúmulo de nutrientes e no crescimento *in vitro* de *S. allagophylla*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Explantes, consistindo de segmentos nodais da região mediana do caule, com aproximadamente 0,8 cm de comprimento e com um par de folhas, foram obtidos de microplantas cultivadas no laboratório do Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp. Estes foram cultivados em meio líquido ½ B5 modificado (apêndice II), com a concentração reduzida de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (de 0,51 mM para 0,10 mM) e de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (de 0,52 mM para 0,01 e 0,02 mM), ferro não quelatado, pH 4,0 e diferentes concentrações de alumínio na forma de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ . O meio foi suplementado com 40 g/L de sacarose e como suporte foi usado papel filtro Whatman nº1.

Soluções de 10 mM de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  em 100 mL de água destilada e de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ , na mesma concentração, foram preparadas previamente, sendo acrescentadas ao meio, após autoclavagem deste, utilizando-se filtro de acetato de celulose esterilizado (Millipore), em uma concentração final de 0,05 mM de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e de 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ .

O valor do pH foi monitorado utilizando-se o indicador verde de bromocresol (5,0 mL/L), adicionado ao meio quando do seu preparo, com o pH tendo sido ajustado, quando necessário, utilizando-se soluções de HCl e NaOH.

Os efeitos de diferentes concentrações de alumínio foram testados em diferentes concentrações de fosfato, diferindo em 8 tratamentos, com 15 repetições. Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4: 2 concentrações de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e 4 concentrações de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$  (tabela 1).

**Tabela 1.** Tratamentos com diferentes concentrações de sais de fosfato e de alumínio

	Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .18H <sub>2</sub> O (μM)			
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O (mM)	0,0	50	100	200
0,01	T1	T3	T5	T7
0,02	T2	T4	T6	T8

Os explantes foram cultivados em câmara de crescimento Forma Scientific, com fotoperíodo de 16 h de luz, intensidade luminosa de 50 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e temperatura de 25 ± 2°C no período de luz e 20 ± 2°C no período de escuro. O período de cultivo foi de 120 dias, sendo 60 dias em tubo de ensaio com 8,0 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro e, os 60 dias restantes, em tubos de ensaio de 15,0 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, com renovação do meio.

O meio líquido ½ B5, ideal para o crescimento *in vitro* de *S. allagophylla*, foi modificado para permitir a disponibilidade do íon alumínio na solução, bem como uma possível maior atividade deste, tendo sido preparado baseado em meios utilizados anteriormente (Conner & Meredith, 1985b; Yamamoto *et al.*, 1994; Van Sint Jan *et al.*, 1997; Ramgareeb *et al.*, 1999). A real disponibilidade do íon alumínio no meio não foi testada, pelo fato da quantidade presente no meio estar abaixo da sensibilidade dos equipamentos disponíveis.

As características comprimento da microplanta, número de folhas, número de raízes, o maior comprimento médio das raízes, presença de raízes secundárias, de microtubérculos, de clorose nas folhas e necrose das raízes, foram registradas após 60 e 120 dias de cultivo. O diâmetro dos microtubérculos foi obtido após os 120 dias. Análises dos dados foram realizadas utilizando programa ANOVA, por meio de comparação de médias pelo teste de Duncan, exceto para a produção de microtubérculos e de raízes secundárias, com os dados tendo sido analisados utilizando-se o *software* SAS (Statistical Analysis System) (SAS Institute, 1986).

No final do cultivo, as partes aéreas das 15 microplantas, de cada tratamento, foram reunidas e pesadas juntas, obtendo-se o peso fresco. Em seguida foram lavadas e secadas em estufa com circulação forçada de ar, com a temperatura variando entre 65-70°C. O material foi pesado, obtendo-se o peso seco, depois moído e encaminhado para a Seção de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), para a determinação dos teores dos elementos, utilizando-se a espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio (ICP-AES).

As microplantas de cada tratamento foram reunidas para que fosse possível a obtenção de ao menos 1,0 g de peso seco de material da planta, que é o peso mínimo necessário para a realização das análises químicas.

Análise de uma amostra do solo, obtida na Reserva Biológica de Moji Guaçu, em área onde cresce *S. allagophylla*, dos teores de matéria orgânica e dos nutrientes, foi realizada no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Seção de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 50 dias de cultivo, nos tratamentos com 200  $\mu\text{M}$  de alumínio (T7 e T8) o valor do pH do meio diminuiu para 3,0 em todos os tubos de cultivo, retornando sempre a este valor um período após a elevação do valor para 4,0, com o uso de NaOH (entre 1-3 dias). Com 60 dias de cultivo, as microplantas crescidas em tais tratamentos apresentaram características de toxidez, com 80% e 60% das plantas apresentando necrose da raiz e 70% e 30% de presença de clorose nas folhas, nos tratamentos T7 (figura 1) e T8, respectivamente. Também, a presença de microtubérculos, de raízes secundárias e o comprimento da microplanta foram significativamente menores nestes tratamentos (figura 2 e tabela 2). Nos demais tratamentos, o valor do pH não se alterou, não houve diferenças significativas no crescimento das microplantas e não foi observada a necrose na raiz e clorose nas folhas, após os 60 dias de cultivo.

A queda no valor do pH, nos tratamentos T7 e T8, pode ser resultante da extrusão de  $\text{H}^+$  pela presença de alumínio em maior concentração, pois como já foi citado, há a hipótese de que íons de alumínio aumentam a polaridade elétrica da membrana celular, estimulando a extrusão de  $\text{H}^+$  (Kidd & Proctor, 2000). Também, há a possibilidade de absorção diferencial de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , bem como a liberação do  $\text{H}^+$  resultante da ligação de um ânion orgânico, excretado pelas microplantas, com o alumínio presente no meio de cultivo. Autores como Peterson & Bottger (1991) e Kerven *et al.* (1995), explicam que a queda dos valores do pH, em soluções nutritivas com alumínio presente, se deve a uma complexação do íon alumínio com um ácido orgânico, o que promove a liberação no meio de um  $\text{H}^+$  do ligante. Foi observado que a espécie acumuladora de alumínio *F. esculentum*, além de utilizar ácido orgânico para o transporte e compartimentação do alumínio na planta, excreta uma quantidade

para o meio (Ma & Hiradate, 2000) e o mesmo pode ter ocorrido com *S. allagophylla*, quando em concentrações maiores de alumínio.

Os danos ocorridos nas raízes e, assim, no crescimento das microplantas nos tratamentos T7 e T8, podem ser atribuídos a um efeito direto do alumínio, pois é bem conhecido como expressão da toxidez do alumínio, o atrofiamento da raiz e a clorose das folhas. Entretanto, tais danos podem ser resultantes não do efeito direto do alumínio, mas de um efeito indireto, ao induzir um excesso de  $H^+$  no meio, comprovado pelo baixo pH. De acordo com Kidd & Proctor (2001), os prejuízos ocorridos em plantas crescendo em substrato ácido, normalmente atribuídos ao alumínio presente, podem ser resultantes da presença do próton, o qual possui efeitos tóxicos semelhantes ao alumínio. Observaram que plantas da espécie *B. pendula*, uma acumuladora de alumínio, tiveram seu crescimento diminuído em solução nutritiva ácida, não pela concentração elevada do alumínio, mas pela presença de  $H^+$  (Kidd & Proctor, 2000).

Com a transferência para os tubos longos, em meio renovado, os valores do pH dos tratamentos T7 e T8 diminuíram novamente para próximo de 3,0 e as microplantas não mais apresentaram crescimento, tendo sido eliminadas após 70 dias de cultivo, mantendo-se as crescidas nos demais tratamentos, nos quais não ocorreram alterações nos valores do pH.

Após 120 dias de cultivo, as microplantas crescidas no tratamento com 100  $\mu M$  de alumínio e menor teor de fosfato (T5), apresentaram microtubérculos com diâmetro significativamente maior em relação àquelas crescidas nos demais tratamentos (tabela 3). Observou-se, também, um maior número de raízes neste tratamento, porém não com valores estatísticos de significância. Para os demais parâmetros não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos (tabelas 3 e 4).

O maior crescimento da parte subterrânea nas microplantas crescidas no tratamento T5, com maior concentração de alumínio e este provavelmente mais disponível, pelo menor teor do sal fosfato no meio, pode estar relacionado com uma maior eficiência na absorção de

nutrientes e no aumento do alongamento celular, efeitos benéficos atribuídos ao alumínio, como citados em Watanabe & Osaki (2002) e Watanabe *et al.* (2005).

A análise química realizada na parte aérea das microplantas forneceu resultados semelhantes aos obtidos na análise das folhas de plantas crescidas no campo (Gomes & Shepherd, 2000). No presente estudo, *S. allagophylla* acumulou mais de 1000 mg/kg de alumínio, com as microplantas crescidas nos tratamentos T5 e T6, com 100  $\mu$ M de alumínio no meio, apresentando maiores teores deste (tabela 5). A espécie não apresentou deficiência dos nutrientes, em comparação com a tabela padrão elaborada por Epstein (1975) para a maior parte das plantas superiores, o que indica que possui mecanismos eficientes para superar a interferência e eliminar os efeitos do alumínio na absorção e transporte dos nutrientes.

Haridasan (1982), também observou que algumas espécies do Cerrado, especialmente das famílias Rubiaceae e Vochysiaceae, são acumuladoras de alumínio e eficientes na absorção de nutrientes.

A alta concentração de alumínio nas microplantas crescidas nos tratamentos T1 e T2 (tabela 5), com ausência do íon no meio de cultivo, pode ser resultante da presença de alumínio nas sementes, bem como no ágar utilizado (Difco Bacto) na germinação e crescimento das plântulas. Análises químicas de diferentes espécies de ágar utilizadas em cultura de tecidos, realizadas por Scholten & Pierik (1998), mostraram uma concentração de 1,333 mmol/kg de alumínio no ágar Difco Bacto. Shinga & Townsend (1985), mostraram que a concentração de alumínio em brotos de macieiras e pereiras aumentou quando a concentração de ágar no meio de cultivo foi maior.

*S. allagophylla* pode ser considerada, além de acumuladora de alumínio, uma acumuladora de manganês, com uma concentração acima de 400 mg/kg da parte aérea seca (considerada uma acumuladora com a concentração acima de 300 mg/kg, de acordo com Haridasan *et al.*, 1987). Análises das folhas de plantas crescidas no campo também

apresentaram níveis altos de manganês (Gomes & Shepherd, 2000). Taylor *et al.* (1998), observaram que altas concentrações de alumínio na solução nutritiva diminuíram a acumulação de manganês nos brotos de ervilha, o que não ocorreu neste estudo, onde a maior concentração de alumínio no meio apresentou uma correlação positiva, tanto com o maior acúmulo de alumínio (figura 3A), como o de manganês (figura 3B) na parte aérea das microplantas.

O teor de ferro obtido (tabela 5) também foi alto, em uma concentração que pode causar toxicidade severa em plantas, sendo a concentração crítica para toxicidade de ferro entre 400 e 1000 mg/kg, de acordo com Furlani (2004).

A análise da amostra do solo mostrou que a espécie cresce em solo extremamente ácido, pobre em nutrientes e bases trocáveis e com altos teores de Fe e de Al trocável (tabela 6).

Os solos do Cerrado apresentam saturação de alumínio, de manganês e de ferro, em níveis tóxicos ao crescimento das plantas. Assim, pode-se afirmar que a acumulação destes elementos na planta estudada é uma estratégia adaptativa da espécie para as condições do Cerrado.

**Tabela 2.** Efeito do alumínio  $[Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O]$  sobre o crescimento *in vitro* de *S. allagophylla* em um período de 60 dias (média  $\pm$  desvio padrão). Cultivo em meio líquido ½ B5, com 40 g/L de sacarose, pH 4,0 e fotoperíodo de 16 h. Médias com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas.

Tratamento		Compr/to das microplantas (cm)***	Número de folhas***	Número de raízes***	Compr/to das raízes (cm)***
$Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$				
0	0,01 mM (T1)	2,7 $\pm$ 1,08 <sup>a</sup>	19,8 $\pm$ 4,76 <sup>a</sup>	7,5 $\pm$ 2,72 <sup>a</sup>	2,9 $\pm$ 0,99 <sup>a</sup>
	0,02 mM (T2)	1,9 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>	18,0 $\pm$ 5,33 <sup>a</sup>	5,0 $\pm$ 1,56 <sup>b</sup>	1,7 $\pm$ 0,97 <sup>b</sup>
50 $\mu$ M	0,01 mM (T3)	1,7 $\pm$ 0,42 <sup>bc</sup>	17,4 $\pm$ 2,12 <sup>a</sup>	4,5 $\pm$ 0,71 <sup>b</sup>	1,5 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup>
	0,02 mM (T4)	2,5 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	18,4 $\pm$ 1,58 <sup>a</sup>	6,7 $\pm$ 1,95 <sup>a</sup>	1,8 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>
100 $\mu$ M	0,01 mM (T5)	1,9 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>	17,0 $\pm$ 2,36 <sup>a</sup>	4,6 $\pm$ 1,58 <sup>b</sup>	1,6 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup>
	0,02 mM (T6)	1,6 $\pm$ 0,17 <sup>bc</sup>	17,2 $\pm$ 1,93 <sup>a</sup>	4,7 $\pm$ 1,06 <sup>b</sup>	1,4 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>
200 $\mu$ M	0,01 mM (T7)	1,2 $\pm$ 0,15 <sup>c</sup>	11,4 $\pm$ 1,35 <sup>b</sup>	3,3 $\pm$ 1,57 <sup>b</sup>	1,0 $\pm$ 0,82 <sup>b</sup>
	0,02 mM (T8)	1,3 $\pm$ 0,16 <sup>c</sup>	13,6 $\pm$ 2,63 <sup>b</sup>	4,0 $\pm$ 2,11 <sup>b</sup>	1,1 $\pm$ 1,19 <sup>b</sup>

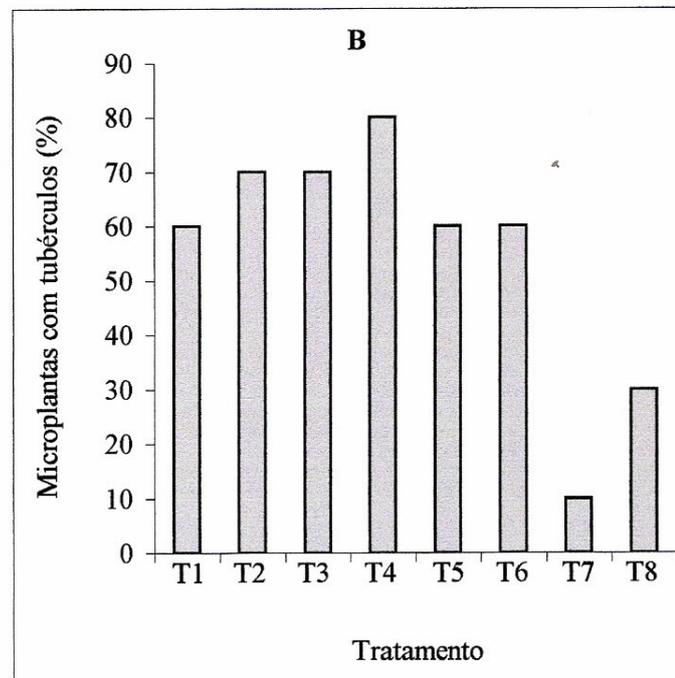
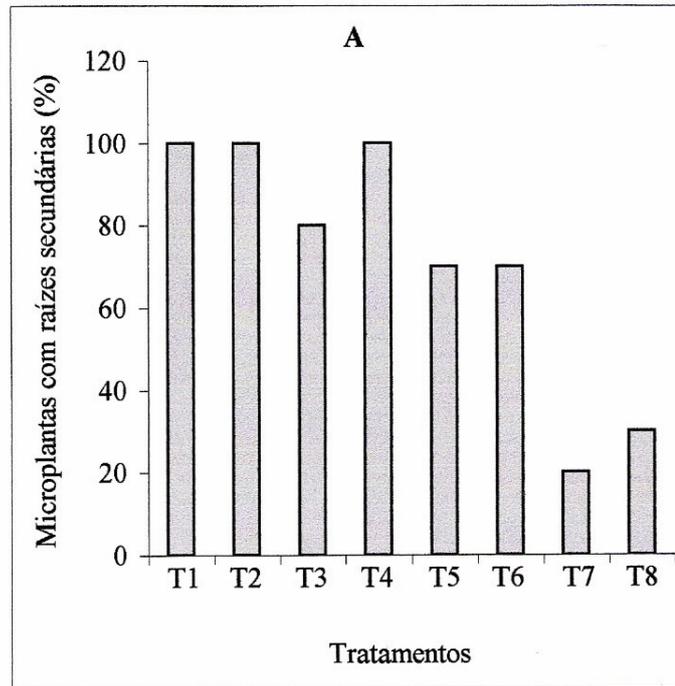
\*\*\*= Diferenças significativas em 0,1% (teste de Duncan)

**Figura 1.** Microplanta de *S. allagopylla* cultivada *in vitro* com 50  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ . Cultivo em um período de 60 dias, em meio líquido  $\frac{1}{2}$  B5, com 40 g/L de sacarose, pH 4,0 e fotoperíodo de 16 h. T3: meio com 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$  e 0,01 mM do sal fosfato; T7: meio com 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$  e 0,01 mM do sal fosfato.



**Figura 2.** Efeito do alumínio [Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.18H<sub>2</sub>O] sobre a produção de raízes secundárias (A) e de microtubérculo (B) em *S. allagophylla* cultivada *in vitro* por 60 dias. Cultivo em meio líquido ½ B5, com 40 g/L de sacarose, pH 4,0 e fotoperíodo de 16 h. Porcentagem significativamente menor de microplantas com raízes secundárias (P< 0,0001) e com microtubérculo (P< 0,0001).

**T1=** sem Al e 0,01 mM de P; **T2=** sem Al e 0,02 mM de P; **T3=** 0,01 mM de P e 50 µM de Al; **T4=** 0,02 mM de P e 50 µM de Al; **T5=** 0,01 mM de P e 100 µM de Al; **T6=** 0,02 mM de P e 100 µM de Al.



**Tabela 3.** Efeito do alumínio [Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.18H<sub>2</sub>O] sobre o crescimento *in vitro* de *S. allagophylla* em um período de 120 dias (média ± desvio padrão). Cultivo, em meio líquido ½ B5, com 40 g/L de sacarose, pH 4,0 e fotoperíodo de 16 h. Médias com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas.

Tratamento		Compr/to das microplantas (cm)	Número de folhas	Número de raízes	Compr/to das raízes (cm)	Diâmetro do micro-tubérculo (mm)***
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .18H <sub>2</sub> O	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O					
0	0,01 mM (T1)	9,4±1,87 <sup>a</sup>	34,4±9,77 <sup>a</sup>	9,1±4,33 <sup>a</sup>	3,4±1,52 <sup>a</sup>	8,2±0,39 <sup>b</sup>
	0,02 mM (T2)	9,8±2,25 <sup>a</sup>	37,3±10,76 <sup>a</sup>	8,7±4,32 <sup>a</sup>	3,0±1,43 <sup>a</sup>	8,1±0,37 <sup>b</sup>
50 µM	0,01 mM (T3)	10,7±2,82 <sup>a</sup>	39,9±12,91 <sup>a</sup>	10,9±4,27 <sup>a</sup>	3,7±1,67 <sup>a</sup>	8,3±0,47 <sup>b</sup>
	0,02 mM (T4)	9,9±1,96 <sup>a</sup>	37,6±13,94 <sup>a</sup>	9,6±5,03 <sup>a</sup>	3,5±5,51 <sup>a</sup>	8,4±0,49 <sup>b</sup>
100 µM	0,01 mM (T5)	9,6±2,78 <sup>a</sup>	36,1±10,24 <sup>a</sup>	12,3±7,55 <sup>a</sup>	2,9±1,39 <sup>a</sup>	8,8±0,50 <sup>a</sup>
	0,02 mM (T6)	9,9±1,96 <sup>a</sup>	39,3±11,33 <sup>a</sup>	9,6±3,85 <sup>a</sup>	3,3±1,18 <sup>a</sup>	8,5±0,51 <sup>b</sup>

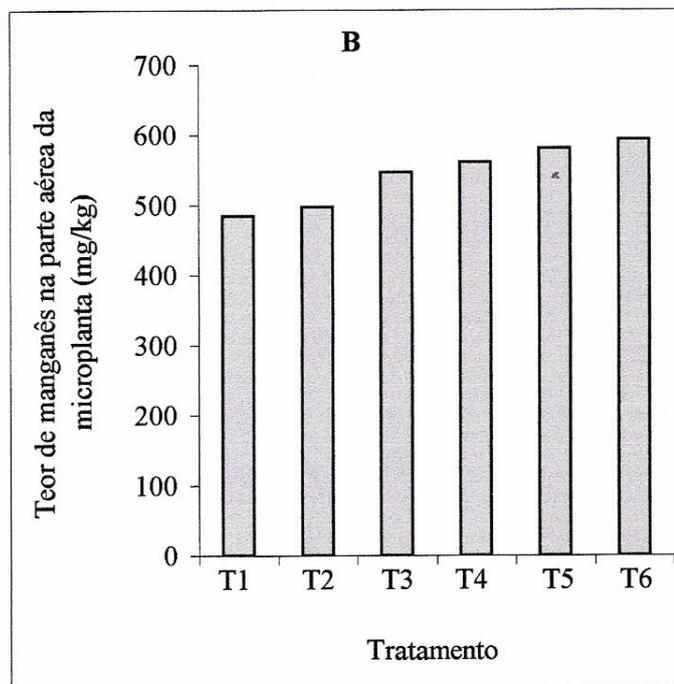
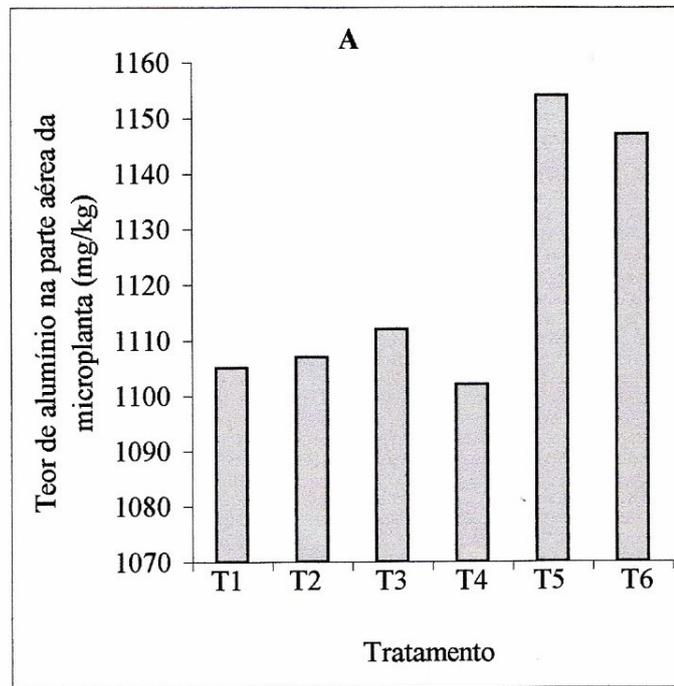
\*\*\*= Diferenças significativas em 0,1% (teste de Duncan)

**Tabela 4.** Massa fresca e massa seca de *S. allagophylla* cultivadas *in vitro* na presença de alumínio [Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.18H<sub>2</sub>O]. Peso obtido da reunião das 15 microplantas de cada tratamento. Cultivo em um período de 120 dias, em meio líquido ½ B5, com 40 g/L de sacarose, pH 4,0 e fotoperíodo de 16h.

	Tratamento					
	Sem Al		50 µM de Al		100 µM de Al	
Massa	0,01 mM de P (T1)	0,02 mM de P (T2)	0,01 mM de P (T3)	0,02 mM de P (T4)	0,01 mM de P (T5)	0,02 mM de P (T6)
Massa fresca (g)	15,37	15,56	15,44	16,49	14,65	14,93
Massa seca (g)	1,053	1,060	1,054	1,065	1,050	1,037

**Figura 3.** Teores de alumínio (A) e de manganês (B) na parte aérea de *S. allagophylla* cultivada *in vitro*. Cultivo em diferentes concentrações de alumínio  $[Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O]$  e do sal fosfato ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ), por um período de 120 dias, em meio líquido ½ B5, com 40 g/L de sacarose, pH 4,0 e fotoperíodo de 16 h.

**T1=** sem Al e 0,01 mM de P; **T2=** sem Al e 0,02 mM de P; **T3=** 0,01 mM de P e 50  $\mu$ M de Al; **T4=** 0,02 mM de P e 50  $\mu$ M de Al; **T5=** 0,01 mM de P e 100  $\mu$ M de Al; **T6=** 0,02 mM de P e 100  $\mu$ M de Al.



**Tabela 5.** Resultado da análise química da parte aérea das microplantas de *S. allagophylla*. Cultivo *in vitro* na presença de diferentes concentrações de alumínio [Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.18H<sub>2</sub>O] e do sal fosfato (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O).

Determinação	Tratamento					
	Sem Al		50 µM de Al		100 µM de Al	
	0,01 mM de P (T1)	0,02 mM de P (T2)	0,01 mM de P (T3)	0,02 mM de P (T4)	0,01 mM de P (T5)	0,02 mM de P (T6)
Macronutriente (g/kg)						
K	50,1	50,5	50,7	51,5	51,2	49,5
P	2,2	2,4	2,5	2,6	2,1	2,8
Ca	3,4	3,6	3,6	3,6	3,7	3,7
Mg	1,4	1,5	1,5	1,5	1,6	1,5
Micronutriente (mg/kg)						
Cu	3,3	3,4	4,1	4,5	3,5	3,9
Fe	431	422	481	563	464	468
Mn	485	497	547	561	581	593
Zn	115,2	113,8	120,1	128,1	119,2	121,4
Al	1105	1107	1112	1102	1154	1147

**Tabela 6.** Resultado da análise química do solo de Campo Cerrado, coletado na Reserva Biológica de Moji Guaçu.

MO	pH	S.B.	H+Al	CTC	V
Mat. Orgânica	Sol. CaCl <sub>2</sub>	Soma Bases	Ac. Potencial	Cap. Toca Cat.	Sat. Bases
g/dm <sup>3</sup>		.....	mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> .....		%
19	3,9	2,2	89	91,8	2

B	Cu	Fe	Mn	Zn	P	K	Ca	Mg	Al
..... mg/dm <sup>3</sup> .....					..... mol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> .....				
0,24	0,4	30	1,1	0,2	2	0,2	1	1	7,08

## CONCLUSÃO GERAL

Para a produção *in vitro* de mudas de *S. allagophylla*, estas com raízes e com o tubérculo que produzem *in natura*, são fatores importantes: (a) uma concentração de 40 g/L de sacarose no meio de cultivo *in vitro*; (b) cultivo em temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante o período de luz e de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  durante o período de escuro; (c) um maior período de cultivo, com a troca de um recipiente baixo para um alto, com renovação do meio; (d) cultivo em intensidade luminosa mais alta ( $50 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) que a normalmente usada para a espécie ( $40 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), utilizando-se a mistura de luz fluorescente com incandescente.

Para o transplântio de *S. allagophylla*, não somente um sistema radicular desenvolvido deve ser obtido *in vitro*, mas também o tubérculo que a espécie produz *in vivo*, este com um diâmetro aproximado de 8,0 mm.

Os resultados obtidos do cultivo *in vitro* de *S. allagophylla* em meio de cultura baseado em solos do Cerrado, com relação à presença de alumínio, baixo pH e deficiências de cálcio e fósforo, mostraram que a espécie é uma acumuladora de alumínio, de manganês e de ferro e que apresenta eficiência em absorver, utilizar e armazenar os nutrientes nestas condições, não apresentando prejuízo em seu crescimento. Pode-se ainda concluir que concentrações de alumínio no meio próximo de 100  $\mu\text{M}$  são favoráveis para o crescimento do microtubérculo. Entretanto, para o cultivo *in vitro* da espécie, concentrações acima de 200  $\mu\text{M}$  não são apropriadas, por induzirem a uma diminuição no valor do pH do meio, cessando o crescimento da microplanta.

## LITERATURA CITADA

- Abdullah, Z.N. & Ahmad, R. 1980. Effect of ABA and GA<sub>3</sub> on tuberization and some chemical constituents of potato. *Plant Cell Physiol.* 21: 1343-1346.
- Adelberg, J.W., Kroggel, M. & Toler, J. 2000. Physical environment *in vitro* affects laboratory and nurse growth of micropropagated Hostas. *HortTechnology* 10: 754-757.
- Ahn, S.J., Rengel, Z. & Matsumoto, H. 2004. Aluminum-induced plasma membrana surface potential and H<sup>+</sup>-ATPase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. *New Phytol.* 162: 71-79.
- Alix, M.J., Savvides, S., Blake, J., Herrmann, R. & Hornung, R. 2001. Effects of illumination source, culture ventilation and sucrose on potato (*Solanum tuberosum*) microtuber production under short days. *Ann. Appl. Biol.* 139: 175-187.
- Alizadeh, S., Mantell, S.H. & Viana, A.M. 1998. *In vitro* shoot culture and microtuber induction in the steroid yam *Dioscorea composita* Hemsl. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 53: 107-112.
- Almeida, V.P. 1994. Tuberização em *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae), uma espécie do cerrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.
- Almeida, V.P. & Shepherd, S.L.K., 1999. *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae): *in vitro* cultivation of a native plant of the Brazilian cerrado. *Rev. Bras. Bot.* 22(3): 381-384.
- Al-Safadi, B., Ayyoubi, Z. & Jawdat, D. 2000. The effect of gamma irradiation on potato microtuber production *in vitro*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 61: 183-187.
- Banfalvi, Z., Molnar, A., Kostyal, Z., Lakatos, L. & Molnar, G. 1997. Comparative studies on potato tuber development using an *in vitro* tuber induction system. *Acta Biol. Hungar.* 48: 77-86.

- Barbosa, S., Brandão, S.C., Caldas, L.S. & Souza, A.C. 2004. Micropropagação do híbrido Pe x SC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. *Pesq. Agropec. Bras.* 39: 725-733.
- Basu, U., Good, A.G., Aung, T., Slaski, J.J., Basu, A., Briggs, K.G. & Taylor, G.J. 1999. A 23-kDa, root exudates polypeptide co-segregates with aluminum resistance in *Triticum aestivum*. *Physiol. Plant.* 106: 53-61.
- Bizarri, M., Borghi, L. & Ranalli, P. 1995. Effects of activated charcoal effects on induction and development of microtubers in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann. Appl. Biol.* 127: 175-181.
- Bondarev, N., Reshetnyak, O. & Nosov, A. 2003. Effects of nutrient medium composition on development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides. *Plant Sci.* 165: 845-850.
- Buzato, S., Sazima, M. & Sazima, I. 2000. Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic Forest sites. *Biotropica* 32 (4): 824-841.
- Calamar, A. & De Klerk, G.J. 2002. Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 70: 207-212.
- Caldas, L.S., Haridasan, P. & Ferreira, M.E. 1990. Meios de cultivo. IN: Técnicas e Aplicações da Cultura de Plantas (A.C. Torres & L.S. Caldas, eds), ABCTP/EMBRAPA-CNPH, Brasília, p. 99-169.
- Camargo, C.E.O. & Ferreira Filho, A.W.P. 1999. Tolerância do alumínio e características agronômicas em populações híbridas de trigo: estimativas de variância, herdabilidade e correlações. *Sci. agric.* 56: 449-457.
- Catapan, E., Otuki, M.F. & Viana, A.M. 2001. *In vitro* culture of *Phyllanthus stipulatus* (Euphorbiaceae). *Rev. Bras. Bot.* 24: 397-403.

- Cavalcanti, R.B. & Joly, C.A., 2002. Biodiversity and conservation priorities in the cerrado region. IN: The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna (P.S. Oliveira & R.J. Marquis, eds), Columbia University Press, New York, pp. 351-367.
- Chang, C., Chen, C.T., Tsai, Y.C. & Chang, W.C. 2000. A tissue culture protocol for propagation of a rare plant, *Lilium speciosum* Thunb. var. *gloriosoides* Baker. Bot. Bull. Acad. Sin. 41: 139-142.
- Charles, G., & Rossignol, M. 1992. Environmental effects on potato plants *in vitro*. J. Plant Physiol. 139: 708-713.
- Chautems, A. 2003. Gênero *Sinningia*. IN: Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo (M.G.L. Wanderley, G.L. Shepherd, A.M. Giulietti & T.S. Melhem, eds), Vol. 3, Fapesp/RiMa, São Paulo, pp. 90-100.
- Čiamporová, M. 2002. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. Biol. Plant. 45: 161-171.
- Conner, A.J. & Meredith, C.P. 1985a. Large scale selection of aluminum-resistant mutants from plant cell culture: expression and inheritance in seedlings. Theor. Appl. Genet. 71: 159-165.
- Conner, A.J. & Meredith, C.P. 1985b. Simulating the mineral environment of aluminium toxic soils in plant cell culture. J. Exp. Bot. 36: 870-880.
- Coutinho, L.M., 1990. Fire in the ecology of the Brazilian Cerrado. IN: Fire in the Tropical Biota. Ecological Studies (J.G., Goldammer, ed), Vol. 84, Springer-Verlag, Berlin. pp. 82-105.
- Cuzzuol, G.R.F., Gallo, L.A. & Cromo, O.J. 1996. Enraizamento de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro* e *ex vitro*. Sci. Agri. 53: 60-66.

- Dantas, A.C., Fortes, G.R.L., Silva, J.B., Nezi, A.N. & Rodrigues, A.C. 2001. Tolerance to aluminium in apple rootstocks somaclones in nutrient solution. *Pesq. Agrop. Bras.* 36: 615-623.
- De Klerk, G.J. 2000. Rooting treatment and the ex-vitrum performance of micropropagated plants. *Acta Hort.* 530: 277-288.
- De Klerk, G.J. 2002. Rooting of microcuttings: theory and practice. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38: 415-422.
- De Klerk, G.J., Van der Krieken, W. & De Jong, J. 1999. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 35: 189-199.
- De Klerk, G.J., Hanecakova, J. & Jasik, J. 2001. The role of cytokinins in rooting of stem slices from apple microcuttings. *Plant Biosyst.* 135: 79-84.
- Debergh, P.C. 2000. Preparation of microplants for *ex vitro* establishment. *Acta Hort.* 530: 269-275.
- Degaspari, M.I., Itaya, N.M., Buckeridge, M.S. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2003. Fructan degradation and hydrolytic in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae), a herbaceous species from the cerrado. *Rev. Bras. Bot.* 26 (1): 11-21.
- Degenhardt, J., Larsen, P.B., Howell, S.H. & Kochian L.V. 1998. Aluminum resistance in the Arabidopsis mutant *alr-104* is caused by an aluminum increase in rhizosphere pH. *Plant Physiol.* 117: 19-27.
- Delhaize, E. Craig, S., Beaton, C.D., Bennet, R.J., Jagadish V.C. & Randall P.J. 1993. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. *Plant Physiol.* 103: 685-693.
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., Gruselle, R., Meler-Dinkel, A., Jay-Allemand, C. & Gaspar, T. 2001. Practical factors controlling *in vitro* adventitious root formation from walnut shoot microcuttings. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 129: 198-203.

- Dong, D., Peng, X. & Yan, X. 2004. Organic acid exudation induced by phosphorus deficiency and/or aluminium toxicity in two contrasting soybean genotypes. *Physiol. Plant.* 122: 190-199.
- Durigan, G., Bitello, J.B., Franco, G.A.C.F. & Siqueira, M.F. 2004. Famílias e espécies. IN: Plantas do Cerrado Paulista: imagens de uma espécie ameaçada (G., Durigan, J.B., Bitello, G.A.C.F., Franco & M.F., Siqueira, eds), Páginas & Letras, São Paulo, pp: 5-438.
- Eiten, G. 1994. Vegetação do Cerrado. Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas (M.N. Pinto, coord.), UnB/SEMATEC, Brasília, pp. 9-65.
- Epstein, L. 1975. Os componentes inorgânicos das plantas. IN: Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas (Ferri, M.G., ed), USP/Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., São Paulo/Rio de Janeiro, p.50-52.
- Ernst, W.H.O., Schat, H. & Verlkeij, J.A.C. 1990. Evolutionary biology of resistance in *Silene vulgaris*. *Evol. Trends Plant* 4: 45-51.
- Espino, F.J., González-Jaen, M.T., Ibáñez, J, Sendino, A.M. & Vásquez, A.M. 1998. Aluminum and low pH effects on translatable RNA population from bean calli. *Protoplasma* 201: 85-91.
- Fageria, N.K., Baligar, V.C. & Wright, R.J. 1988. Aluminum toxicity in crop plants. *J. Plant Nutr.* 11: 303-319.
- Fay, M.F., 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 28: 1-4.
- Ferri, M.G., 1969. Plantas do Brasil – espécies do cerrado. E. Blucher & EDUSP, São Paulo, p.178-179.
- Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Dietrich, S.M.C., Chu, E.P., Carvalho, M.A.M., Vieira, C.C.J. & Graziano, T.T. 1986. Reserve carbohydrates in underground organs of native Brazilian plants. *Rev. Brasil. Bot.* 9: 159-166.

- Filgueiras, T.S., 2002. Herbaceous plant communities. IN: The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna (P.S. Oliveira & R.J. Marquis, eds), Columbia University Press, New York, pp. 121-139.
- França, S.C.; Duarte, I.B.; Moraes, R.M. & Pereira, A.M.S. 1995. Micropropagação of *Stryphnodendron polyphythum* (barbatimão). Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 24: 291-293.
- Franco, A.C., 2002. Ecophysiology of woody plants. IN: The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna (P.S. Oliveira & R.J. Marquis, eds), Columbia University Press, New York, pp. 178-197.
- Furlani, P.R. 1989. Efeitos fisiológicos do alumínio em plantas. IN: II Simpósio Avançado de Solos e Nutrição de Plantas, Campinas, Brasil, anais, p. 73-85.
- Furlani, A.M.C. 2004. Nutrição Mineral. IN: Fisiologia Vegetal (G.B. Kerbauy, ed), Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p. 40-75.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. & Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exptl. Cell Res. 50: 151-158.
- Gamburg, K.Z.; Vysotskaya, E.F.; Gamanets, L.V. 1999. Microtuber formation in micropropagated Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 55: 115-118.
- Garner, N. & Blake, J. 1989. The induction and Development of Potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. Ann. Bot. 63: 663-674.
- Gebhardt, K. 1985. Development of a sterile cultivation system for rooting of shoot tip cultures (Red Raspberries) in duroplast foam. Plant Sci. 39:141-148.
- Gebhardt, K. & Friedrich, M. 1987. Micropropagation of *Calluna vulgaris* cv. 'H. E. Beale'. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 9: 137-145.

- Ghaderian, S.M., Lyon, A.J.E. & Baker, A.J.M. 2000. Seedling mortality of metal hyperaccumulator plants resulting from damping-off by *Pythium* spp. *New Phytol.* 146: 219-224.
- Gollagunta, V., Adelberg, J.W., Rieck, J. & Rajapakse, N. 2004. Sucrose concentration in liquid media affects soluble carbohydrates, biomass and storage quality of micropropagated hosta. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 77; 125-131.
- Gomes, M.A.N. 1999. Estudos *in vitro* com a espécie do cerrado: *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Mestrado.
- Gomes, M.A.N. & Shepherd, S.L.K. 2000. Estudo de nutrição mineral *in vitro* relacionado à adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições de cerrado. *Rev. Bras. Bot.* 23(2): 152-159.
- Gomes, M.A.N. & Shepherd, S.L.K. 2002. Morfogênese e crescimento *in vitro* de *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae): efeitos de fitorreguladores e de fotoperíodo. *Acta Hort.* 569: 303-309.
- Gopal, J., Minocha, J.L. & Dhaliwal, H.S. 1998. Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Rep.* 17: 794-798.
- Gopal, J., Chamail, A. & Sarkar, D. 2004. *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germplasm: effect of genotype, abscisic acid, and sucrose. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40: 485-490.
- Grattapaglia, D & Machado, M.A. 1990. Micropropagação. IN: Técnicas e Aplicações da Cultura de Plantas (A.C. Torres & L.S. Caldas, eds), ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, Brasília, p. 99-169.
- Grigoriadou, K., Vasilakakis, M. & Eleftheriou, E.P. 2002. *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar 'Chondrolia Chalkidikis'. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 71: 47-54.

- Haridasan, M., 1982. Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil. *Plant Soil* 65: 265-273.
- Haridasan, M., 1988. Performace of *Miconia albicans* (SW) Triana, an aluminium-accumulating species, in acidic and calcareous soils. *Commu. In Soil Sci. Plant Anal.* 19: 1091-1103.
- Haridasan, M. 2000. Nutrição mineral de plantas nativas do Cerrado. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 2: 54-64.
- Haridasan, M., Hill, P.G. & Russell, D., 1987. Semiquantitative estimates of Al and other cations in the leaf tissues of some Al-accumulating species using electron probe microanalysis. *Plant Soil* 104: 99-102.
- Herrington, E. & McPherson, J.C. 1993. Light quality growth promotion of *Spiraea nipponica*: the influence of a low photon fluence rate and tranfer time to a higher fluence rate. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 32: 161-167.
- Hiraoka, N.; Kato, Y.; Kawaguchi, Y.; Chang, J.I. 2001. Micropropagation of *Corydalis ambigua* through embryogenesis of tuber sections and chemical evaluation of ramets. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 67: 243-249.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Expt. Sta. Circ* 347.
- Islam, M.A., Klappstech, K. & Jacobsen, H.J. 2004. Efficient procedure for *in vitro* microrhizome induction in *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) – a medicinal plant of Tropical Asia. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 14: 123-134.
- Jackson, S.D., James, P., Prat, S. & Thomas, B. 1998. Phytochrome B affects the levels of a graft-transmissible signal involved in tuberization. *Plant Physiol.* 117: 29-32.
- Jansen, S., Broadley, M.R., Robbrecht, E. & Smets, E., 2002. Aluminum hyperaccumulation in Angiosperms: a review of its phylogenetic significance. *Bot. Rev.* 68: 235-269.

- Jeong, J.H. 1996. *In vitro* propagation of bulb scale section of several Korean native lilies. *Acta Hort.* 414: 269-276.
- Jiang, R.F., Ma, D.Y., Zhao, F.J. & McGrath, S.P. 2005. Cadmium hyperaccumulation protects *Thlaspi caerulescens* from leaf feeding damage by thrips (*Frankliniella occidentalis*). *New Phytol.* 167: 805-814.
- Jiménez, E., Pérez, N., Feria, M., Barbón, R., Capote, A., Chávez, M., Quiala, E. & Pérez, J.C. 1999. Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 59: 19-23.
- John, J.L., Courtney, W.H. & Decoteau, D.R. 1993. The influence of plant growth regulators and light on microtuber induction and formation in *Dioscorea alata* L. cultures. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 34: 245-252.
- Kahane, R., Teyssendier de la Serve, B. & Rancillac, M. 1992. Bulbing in long-day onion (*Allium cepa* L.) cultured *in vitro*: comparison between sugar feeding and light induction. *Ann. Bot.* 69: 551-555.
- Kahane, R., Pitiot, C., Chamaux, C., Vialle-Guèrin, E. & Schweisguth, B. 2001. Non-structural carbohydrate composition of long-day onion *in vitro*. *Journal of Hort. Sci. Biotechnol.* 76 (3): 320-326.
- Kane, M.E., Gillis, M.R., Philman, N. & Campbell, S. 2000. Seasonal differences in *ex vitro* growth and corm formation between two micropropagated *Sagittaria latifolia* ecotypes. *Acta Hort.* 520: 229-238.
- Karsai, I. & Bedő, Z. 1998. Relationship between anther culture response and aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 100: 249-252.
- Kerven, G.L., Larsen, P.L., Bell, L.C. & Edwards, D.G., 1995. Quantitative Al NMR spectroscopic studies of Al (III) complexes with organic acid ligands and their comparison with GEOCHEM predicted values. *Plant Soil* 171: 35-39.

- Khuri, S. & Moorby, J. 1995. Investigations into the role of sucrose in potato cv. Estima microtuber production *in vitro*. *Ann. Bot.* 75: 295-303.
- Kidd, P.S. & Proctor, J. 2000. Effects of aluminium on the growth and mineral composition of *Betula pendula* Roth. *J. Exp. Bot.* 51:1057-1066.
- Kidd, P.S. & Proctor, J. 2001. Why plants grow poorly on very acid soils: are ecologists missing the obvious? *J. Exp. Bot.* 52: 791-799.
- Kim, B.Y., Baier, A.C., Somers, D.J. & Gustafson, J.P. 2001. Aluminum tolerance in triticale, wheat and rye. *Euphytica* 120: 329-337.
- Kim, K. & Jang, G. 2004. Micropropagation of *Drosera peltata*, a tuberous sundew, by shoot tip culture. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 77: 211-214.
- Kinraide, T.B. 1993. Aluminum enhancement of plant growth in acid rooting media. A case of reciprocal alleviation of toxicity by toxic cations. *Physiol. Plant.* 88: 619-625.
- Kinraide, T.B. 2003. Toxicity factors in acidic forest soils: attempts to evaluate separately the toxic effects of excessive  $Al^{3+}$  and  $H^+$  and insufficient  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  upon elongation. *Eur. J. Soil Science* 54: 323-333.
- Kochian, L.V. 1995. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 237-260.
- Konishi, S., Miyamoto, S. & Taki, T. 1985. Stimulatory effects of aluminium on tea plants grown under low and high phosphorus supply. *Soil Sci. Pl. Nutr.* 31: 361-368.
- Korocho, A.R., Juliani Jr., H.R., Juliani, H.R. & Trippi, V.S. 1997. micropropagation and acclimatization of *Hedeoma multiflorum*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 48: 213-217.
- Larsen, P.B., Degenhardt, J., Tai, C., Stenzler, L.M., Howell, S.H. & Kochian, L.V. 1998. Aluminum – resistant Arabidopsis mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. *Plant Physiol.* 117: 9-18.

- Larsen, P.B., Geisler, M.J.B., Jones, C.A., Williams, K.M. & Cancel, J.D. 2005. ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J.* 41: 353-363.
- Le Guen-Le Saos, F., Hourmant, A., Esnault, F. & Chawin, J.E. 2002. *In vitro* bulb development in Shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum Group): effects of anti-gibberellins, sucrose and light. *Ann. Bot.* 89: 419-425.
- Li, X.F., Ma, J.F., Hiradate, S. & Matsumoto, H. 2000. Mucilage strongly binds aluminum but does not prevent roots from aluminum injury in *Zea mays*. *Physiol. Plant.* 108: 152-160.
- Liao, Z., Chen, M., Tan, F., Sun, X. & Tang, K. 2004. Micropropagation of endangered Chinese aloe. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 76: 83-86.
- Lino, M. 1982. Action of red light on indole-3-acetic-acid status and growth in coleoptiles maize seedlings. *Planta* 156: 21-32.
- Liu, J. & Xie, C. 2001. Correlation of cell division and cell expansion to potato microtuber growth *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 67: 159-164.
- Llugany, M., Poschenrieder, C. & Barceló, J. 1995. Monitoring of aluminium-induced inhibition of root elongation in four maize cultivars differing in tolerance to aluminium and proton toxicity. *Physiol. Plant.* 93: 265-271.
- Lopes, T.C.C., Andreato, R.H.P. & Chautems, A. 2004. Levantamento das Generiaceae do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. IN: 54º Congresso Nacional de Botânica e 3ª Reunião Amazônica de Botânica. Universidade da Amazônia, Belém-Ananindeua-Pará. Web: [www.adaltech.com.br/evento/museugoldi/resumoshtm](http://www.adaltech.com.br/evento/museugoldi/resumoshtm).
- Lüttge, U. 1997. Savannas. IN: *Physiological Ecology of tropical Plants* (U. Lüttge, ed), Springer-Verlag, Berlin, pp. 251-320.
- Ma, J.F. 2000. Role of organic in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiol.* 41: 383-390.

- Ma, J.F. & Hiradate, S. 2000. Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Planta* 211: 355-360.
- Ma, J.F., Hiradate, S., Nomoto, K., Iwashita, T & Matsumoto, H. 1997a. Internal detoxification mechanism of Al in *Hydrangea*. *Plant Physiol.* 113: 1033-1039.
- Ma, J.F., Zheng, S.J. & Matsumoto, H. 1997b. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Pl. Cell Physiol.* 38: 1019-1025.
- Ma, J.F., Taketa, S. & Yang, Z.M. 2000. Aluminium tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in *Triticale*. *Pl. Physiol.* 122: 698-694.
- Ma, J.F., Ryan, P.R. & Delhaize, E. 2001. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organics acids. *Trends Plant Sci.* 6: 273-278.
- Macedo, C.C., Kinet, J.M. & Van Sint Jan, V. 1997. Effects of duration and intensity of aluminum stress on growth parameters in four rice genotypes differing in aluminum sensitivity. *J. Plant Nutr.* 20: 181-193.
- Malavolta, E. & Kliemann, H.J., 1985. Deficiências e excessos. In *Desordens Nutricionais no Cerrado*. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba, p. 05-65.
- Mantell, S.H. & Hugo, S.A. 1989. Effects of photoperiod, mineral strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and *D. bulbifera* L. yams. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 16: 23-37.
- Mantovani, W. & Martins, F.R., 1988. Variações fenológicas das espécies de cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçú, São Paulo. *Rev. Bras. Bot.* 11: 101-112.
- Marschner, H., Sattelmacher, B. & Bangerth, F. 1984. Growth rate of potato tubers and endogenous contents of indolylacetic acid and abscisic acid. *Physiol. Plant.* 60: 16-20.
- Martin, K.P. 2003. Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipea malabarica* (Rechb. F.) J.D. hook, an endangered orchid. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39: 322-326.

- Martínez-García, J.F., García- Martínez, J.L., Bou, J. & Prat, S. 2002. The interaction of gibberellins and photoperiod on the control of potato tuberization. *J. Plant Growth Regul.* 20: 377-386.
- Martinussen, I., Nilsen, G., Svenson, L. Junttila, O. & Rapp, K. 2004. *In vitro* propagation of cloudberry (*Rubus chamaemorus*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 78: 43-49.
- Masunaga, T., Kubota, D., Hotta, M. & Wakatsuki, T. 1998. Mineral composition of leaves and bark in aluminum accumulators in a tropical rain forest in Indonesia. *Soil Sci. Pl. Nutr.* 44: 347-358.
- Matsumoto, H. 2000. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 200: 1-46.
- Matsumoto, H., Hirasawa, H., Morimura, S. & Takahashi, E. 1976. Localization of aluminum in tea leaves. *Plant Cell Physiol.* 17: 627-631.
- McClelland, M.T. & Smith M.A.L. 1988. Response of woody plant microcuttings to *in vitro* and *ex vitro* rooting methods. *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 38:593-599.
- Meir, S., Philosophos-Hadas, S., Epstein, E. & Aharoni, N. 1985. Carbohydrates stimulate ethylene production in tobacco leaf dises. 1. Interaction with auxin and the relation to auxin metabolism. *Plant Physiol.* 78: 131-138.
- Melo, J.T., Silva, J.A., Torres, R.A.A., Silveira, C.E.S. & Caldas, L.S., 1998. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado. IN: Cerrado: ambiente e flora (M.S. Sano & S.P. Almeida, eds), Embrapa, Planaltina, DF, pp. 195-243.
- Menzel, B.M. 1980. Tuberization in potato (*Solanum tuberosum*) cultivar Sebago at high temperatures: responses to gibberellin and growth inhibitors. *Ann. Bot.* 46: 259-266.
- Mercier, H & Kerbaux, G.B., 1998. Endogenous IAA and cytokinin levels in bromeliad shoots as influenced by glutamine and ammonium nitrate treatments. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 10(3): 225-228.

- Meredith, C.P. 1978. Selection and characterization of aluminum-resistant variants from tomato cell cultures. *Plant Sci. Letters* 12: 25-34.
- Miranda, H.S., Bustamanta, M.M.C. & Miranda, A.C., 2002. The fire factor. IN: *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna* (P.S. Oliveira & R.J. Marquis, eds), Columbia University Press, New York, pp. 51-68.
- Mistro, J.C., Camargo, C.E.O. & Pettinelli-Junior, A. 2001. Avaliação de genótipos de trigo, de diferentes origens, em relação à toxicidade do alumínio. *Bragantia* 60: 177-184.
- Miyasaka, S.C., Buta, J.G., Howell, R.K. & Foy, C.D. 1991. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. *Plant Physiol.* 96: 737-743.
- Monteuuis, O. 2001. *In vitro* micropropagation and rooting of *Acacia mangium* microshoots from juvenile and mature origins. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 10: 102-107.
- Moreira, M.F., Vieira, C.C.J. & Zaidan, L.B.P. 1999. Efeito do fotoperíodo no crescimento em plantas aclimatizadas de *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. (Amaranthaceae). *Rev. Bras. Bot.* 22: 397-403.
- Mossor-Pietraszewska, T. 2001. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. *Acta Biochim. Polonica* 48: 673-686.
- Mullins K.V. 1987. Micropropagation of Chestnut (*Castanes sativa* Mill.). *Acta Hortic.* 212: 520-525.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Myers, N., Mittermeier, C., Mittermeier, G., Fonseca, G.A.B. & Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nand, N., Drew, R.A. & Ashmore, S. 2004. Micropropagation of two Australian native fruit species, *Davidsonia pruriens* and *Davidsonia jerseyana*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 77: 193-201.

- Nayak, S. 2000. *In vitro* multiplication and microrhizome induction in *Curcuma aromatica* Salisb. *Plant Growth Regul.* 32: 41-47.
- Newell, C., Grown, D. & McComb, J. 2003. The influence of medium aeration on *in vitro* rooting of Australian plant microcuttings. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 75: 131-142.
- Ng, S.Y.C. 1988. *In vitro* tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 14: 121-128.
- Offord, C.A. & Campbell, L.C. 1992. Micropropagation of *Telopea speciosissima* R. Br. (Proteaceae). 2: Rhizogenesis and acclimatization to *ex vitro* conditions. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 29: 223-230.
- Oliveira-Filho, A.T. & Ratter, J.A. 2002. Vegetation physiognomies and woody flora of the Cerrado Biome. IN: *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna* (P.S. Oliveira & R.J. Marquis, eds), Columbia University Press, New York, pp. 91-120.
- Osaki, M., Watanabe, T. & Tadano, T. 1997. Beneficial effect of aluminum on growth of plants adapted to low pH soils. *Soil Sci. Pl. Nutr.* 43: 551-563.
- Osawa, H. & Matsumoto, H., 2001. Possible involvement of protein phosphorylation in aluminum-responsive malate efflux from wheat root apex. *Plant. Physiol.* 126: 411-420.
- Patil, V.M. 1998. Micropropagation studies in *Ceropegia spp.* *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34: 240-243.
- Peixoto, M. & Salviani, R. 2003. *Sinningia*. Web: [www.mpeixoto.sites.uol.com.br](http://www.mpeixoto.sites.uol.com.br).
- Pellet, D.M., Papernick, L.A., Jones, D.L., Darrah, P.R., Grunes, D.L. & Kochian L.V. 1997. Involvement of multiple aluminium exclusion mechanisms in aluminium tolerance in wheat. *Plant Soil* 192: 63-68.
- Pereira de Sá, S.P. 1991. Micropropagação de *Dalbergia miscolobium* e *D. Nigra*. IN: *Encontro de Botânicos do Centro-Oeste, Brasília, Brasil, resumos*, p. 47.

- Pereira, B.A.S. 1992. A flora nativa. IN: Alternativas de Desenvolvimento do Cerrados: Manejo de Recursos Naturais Renováveis (B.F.S. Dias, ed), Brasília: Fundação Pró-Natureza, pp. 53-57.
- Pereira, A.M.S., Amui, S.F., Bertoni, B.W., Moraes, R.M. & França, S.C. 2000. Micropropagation of *Salix humboldtiana* Hild. Rev. Bras. Plantas Med. 2: 17-21.
- Pereira, A.M.S., Amui, S.F., Bertoni, B.W., Moraes, R.M. & França, S.C. 2003. Micropropagation of *Anemopaegma arvense*: Conservation of an Endangered Medicinal Plant. Planta Med 69: 571-573.
- Pereira, J.E.S., Fortes, G.R.L & Da Silva, J.B. 1999. Effect of gibberellic acid on one year apple rootstock plant growth in the greenhouse. HortSci. 34: 493.
- Pereira, J.E.S. & Fortes, G.R.L. 2003. Protocolo para a produção de material propagativo de batata em meio líquido. Pesq. Agropec. Bras. 38: 1035-1043.
- Perl, A., Aviv, D., Willmitzer, L. & Galun, E. 1991. *In vitro* tuberization in transgenic potatoes harboring  $\beta$ -glucuronidase linked to a patatin promoter: effects of sucrose levels and photoperiods. Plant Sci. 73: 87-95.
- Perret, M., Chautems, A., Spichiger, R., Peixoto, M. & Savolainen, V., 2001. Nectar sugar composition in relation to pollination syndromes in Sinningieae (Gesneriaceae). Ann. Bot. 87:267-273.
- Peterson, W. & Bottger, M., 1991. Contribution of organic acids to the acidification of the rhizosphere of maize seedlings. Plant Soil 132; 159-163.
- Pletsch, M. 2003. Compostos naturais biologicamente ativos – A Aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Web: [www.biotecnologia.com.br/4hp-4.htm](http://www.biotecnologia.com.br/4hp-4.htm).
- Pollard, A.J. 2000. Metal hyperaccumulation: a model system for coevolutionary studies. New Phytol. 146: 179-181.

- Ramgareeb, S., Watt, M.P., Marsh, C. & Cooke, J.A. 1999. Assessment of Al<sup>3+</sup> availability in callus media for creening tolerant genotypes of *Cynodon dactylon*. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 56: 65-68.
- Ramos, L.C.S., Camargo, C.E.O., Ferreira Filho, A.W.P., Yokoo, E.Y., Castro, J.J., Pettinelli Júnior, A & Silva, M.R. 2000. Melhoramento do trigo: avaliação de linhagens diaplóides obtidas via cultura de anteras. *Sci. agric.* 57: 177-183.
- Ranalli, P., Bassi, F., Ruaro, G., Del Re, P., Dicandilo, M. & Mandolmo, G. 1994. Microtuber and minituber production and field performance compared with normal tubers. *Potato Res.* 37: 383-391.
- Ratter, J.A., Ribeiro, J.F. & Bridgewater, S., 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Ann. Bot.* 80: 223-230.
- Rengel, Z. 1992. Role of calcium in aluminium toxicity. *New Phytol.* 121: 499-513.
- Riquelme, C., Guiñazu, M.E. & Tizio, R. 1991. Pre-acondicionamiento y aclimatación en condiciones de invernáculo de plântulas micropropagadas de frutilla, menta, papa y vid. *Phyton*, 52: 73-82.
- Ritchie, G.S. 1994. Role of dissolution and precipitation of minerals in controlling soluble aluminium in acidic soils. *Adv. Agron.* 53: 47-83.
- Rizzini, C.T., 1997. O Cerrado. IN: Tratado de fitogeografia do Brasil – aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos (C.T. Rizzini, ed), Âmbito Cultural Edições Ltda, Rio de Janeiro, pp. 409-482.
- Roche, T.D., Long, R.D., Sayegh, A.J. & Hennerty, M.J. 1996. Commercial scale photo-autotrophic micropropagation applications in Irish agriculture, horticulture and forestry. *Acta Hortic.* 440: 515-520.

- Rodrigues-Otubo, B.M., Usberti, J.A.F., Siqueira, W.J., Domingues, E.T., Granja, N.P. & Miranda, H.S.F. 1999. Resposta de diferentes genótipos de batata à tuberização *in vitro*. *Bragantia* 58: 227-233
- Romanov, G.A., Aksenova, N.P., Konstantinova, T.N., Golyanovskaya, S.A., Kossmann, J. & Willmitzer, L. 2000. Effect of indole-3-acetic acid and kinetin on tuberisation parameters of different cultivars and transgenic lines of potato *in vitro*. *Plant Growth Regul.* 32: 245-251.
- Rout, G.R., Palai, S.K, Samantaray, S. & Das, P. 2001. Effect of growth and culture conditions on shoots multiplication and rhizome formation in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37: 814-819.
- Ruggiero, P.G.C., Batalha, M.A., Pivello, V.R. & Meirelles, S.T. 2002. Soil-vegetation relationships in cerrado (Brazilian savanna) and semideciduous forest, Southeastern Brazil. *Plant Ecology* 160: 1-16.
- Rugini, E. & Verma, D.C. 1982. Micropropagation of difficult to propagate almond (*Prunus amygalus* Batsch) cultivar. *Pl. Sci. Lett.* 28: 273-281.
- Salomon, M.V., Camargo, C.E.O., Petinelli Jr. & Azevedo Filho, J.A. 2003. Desempenho de linhagens diaplóides de trigos obtidas por cultura de anteras. *Sci. agric.* 60: 43-50.
- Samac, D.A. & Tesfaye, M. 2003. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils – a review. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 75: 189-207.
- Sarowar, S., Oh, H.Y., Hyung, N.I., Min, B.W., Harn, C.H., Yang, S.K., Ok, S.H. & Shin, J.S. 2003. *In vitro* micropropagation of a *Curcubita* interspecific hybrid cultivar – a root stock plant. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 75: 179-182.
- SAS Institute, Inc. 1986. SAS User guide: Statistics, 6<sup>th</sup>. d. Cary, editora, 1028p.
- Scholten, H.J. & Pierik, R.L.M. 1998. Agar as gelling agent: chemicas and physical analysis. *Plant Cell Rep.* 17: 230-235.

- Septímio, L.R., 1994. As plantas: nome vulgar, caracterização botânica, uso terapêutico. IN: A Fitoterapia Brasileira Baseada em Ervas Medicinais do Cerrado. SIPE – Secretaria de Intercâmbio e Projetos Especiais, Brasília, p. 27- 90.
- Sheelavantmath, S.S., Murthy, H.N., Pyati, A.N., Ashok Kumar, H.G. & Ravishankar, B.V. 2000. *In vitro* propagation of the endangered orchid, *geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. Through rhizome section culture. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 60: 151-154.
- Shen, R., Ma, J.F. & Kyo, M. 2002. Compartmentation of aluminium in leaves of an Al-accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. Planta 215: 394-398.
- Shinga, S. & Townsend, E.C. 1985. Mineral nutrient status of crabapple and pear shoots cultured *in vitro* on varying concentrations of three commercial agars. J. Am. Soc. Hort. Sci. 110: 407-411.
- Shirgurkar, M.V., John, C.K. & Nadgauda, R.S. 2001. Factors affecting *in vitro* microrhizomes production in tumeric. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 64: 5-11.
- Silva, I.R., Smyth, T.J., Raper, C.D., Carter, J.E. & Ruffy, T.W. 2001. Differential aluminum tolerance in soybean: an evaluation of the role of organic acids. Physiol. Plant. 112: 200-210.
- Simko, I. 1994. Sucrose application causes hormonal changes associated with potato tuber induction. J. Plant Growth Regul. 13: 73-77.
- Sivaguru, M., Yamamoto, Y., Rengel, Z., Ahn, S.J. & Matsumoto, H. 2005. Early events responsible for aluminum toxicity symptoms in suspension-cultured tobacco cells. New Phytol. 165: 99-109.
- Souza, I.R.P., Alves, V.M.C., Parentoni, S.N., Oliveira, A.C., Teixeira, F.F., MacAdam, I.W. & Purcino, A.A. 2002. Change in root apical protein and peroxidase activity in response to aluminium in tolerant and sensitive maize inbred lines. Braz. J. Plant Physiol. 14: 219-224.

- Štajner, N., Bohanec, B. & Jakše, M. 2002. *In vitro* propagation of *Asparagus maritimus* – A rare Mediterranean salt-resistant species. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 70: 269-274.
- Suri, S.S., Jain, S., Arora, D.K. & Ramawat, K.G. 1999. *In vitro* high frequency of plantlets and tuberous root formation in *Clorophytum borivilianum*. *Gartenbauwissenschaft* 61: 106-110.
- Taiz L. & Zeiger, E. 2004. Fotossíntese: as reações luminosas. IN: *Fisiologia Vegetal* (L. Taiz & E. Zeiger; trad. E. R. Santarém *et al.*, eds), 3.ed., Porto Alegre: Artmed, p. 139-172.
- Taylor, G.J. 1995. Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminium resistance. *Plant Soil* 171: 89-103.
- Taylor, G.J., Blamey, F.P.C. & Edwards, D.G. 1998. Antagonistic and synergistic interactions between aluminum and manganese on growth of *Vigna unguiculata* at low ionic strength. *Physiol. Plant.* 104: 183-194.
- Taylor, G.J., McDonald-Stephens, J.L., Hunter, D.B., Bertsch, P.M., Elmore, D., Rengel, Z. & Reid, R.J. 2000. Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Plant Physiol.* 123: 987-996.
- Thomas, B. & Vince-Prue, O. 1997. Daylength perception in long-day. IN: *Photoperiodism of Plants*. Academic Press, London, pp. 119-142.
- Van Sint Jan, V., Macedo, C.C., Kinet, J.M. & Bouharmont, J. 1997. Selection of Al-resistant plants from a sensitive cultivar, using somaclonal variation, *in vitro* and hydroponic cultures. *Euphytica* 97: 303-310.
- Watanabe, T. & Osaki, M. 2002. Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native species growing in acid soils: a review. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 33: 1247-1260.

- Watanabe, T., Osaki, M. & Tadano, T. 1997. Aluminum-induced growth stimulation in relation to calcium, magnesium, and silicate nutrition in *Melastoma malabathricum* L. Soil Sci. Pl. Nutr. 43: 827-837.
- Watanabe, T., Jansen, S. & Osaki, M. 2005. The beneficial effect of aluminium and the role of citrate in Al accumulation in *Melastoma malabathricum*. New Phytol. 165: 773-780.
- Wilfried, H.O. 2000. Evolution of metal hyperaccumulation and phytoremediation hype. New Phytol. 146: 357-358.
- Wu, C., Liao, C.Y., Hu, B., Yi, K.K., Jin, W.Z., Ni, J.J. & He, C., 2000. QTLs and epistasis for aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at different seedling stages. Theor. Appl. Genet. 100: 1295-1303.
- Xu, X., Van Lammeren, A.M., Vermeer, E. & Vreugdenhil, D. 1998. The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation *in vitro*. Plant Physiol. 117: 575-584.
- Yamamoto, Y., Rikiishi, S., Chang, Y., Ano, K., Kasai, M. & Matsumoto, H. 1994. Quantitative estimation of aluminium toxicity in cultured tobacco cells: correlation between aluminium uptake and growth inhibition. Plant Cell Physiol. 35: 575-583.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y. & Matsumoto, H. 2001. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. Plant Physiol. 125: 199-208.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S.R., Rikiishi, S. & Matsumoto, H. 2002. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. Plant Physiol. 128: 63-72.
- Yu, T.A., Yeh, S.D., Cheng, Y.H. & Yang, J.S. 2000. Efficient rooting for establishment of papaya plantlets by micropropagation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 61: 29-35.

- Yu, W.C., Joyce, P.J., Cameron, D.C. & McCown, B.H. 2000. Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. *Plant Cell Rep.* 19: 407-413.
- Zaidan, L.B.P. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., 1995. Aproveitamento econômico de espécies nativas. In: Relatório do Workshop “Bases para a Conservação e Uso Sustentável das Áreas de Cerrado do Estado de São Paulo”. Probio-SMA, São Paulo, p. 47.
- Ziller, S.R. 2003. A estepe Gramíneo-Lenhosa no Segundo Planalto do Paraná: Diagnóstico Ambiental com Enfoque à Contaminação Biológica. Web: [www.institutohorus.org.br/download/artigos/Contbiocampostese.pdf](http://www.institutohorus.org.br/download/artigos/Contbiocampostese.pdf).
- Zimmerman, R.H. 1988. Micropropagation of woody plants: post tissue culture aspects. *Acta Hortic.* 227: 489-499.

## **APÊNDICE**

## APÊNDICE I

**Composição do meio de Gamborg *et al* (1968), com a composição salina básica original reduzida à metade (1/2 B5)**

Meio MS		
Componente	mg/L	mM
<b>Macronutriente</b>		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	67	0,50
KNO <sub>3</sub>	1250	12,35
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	75	0,57
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	125	0,50
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	75	0,52
<hr/>		
<b>Micronutriente</b>		
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5,0	0,029
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,0	0,003
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5	0,024
KI	0,375	0,002
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,125	0,0005
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,012	*
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,012	*
<hr/>		
<b>FeEDTA</b>		
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	9,32	0,050
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	6,95	0,05

Fonte: Caldas *et al.* (1990)

## APÊNDICE II

**Meio de Gamborg *et al* (1968), com a composição salina reduzida à metade (1/2 B5)  
modificado**

Meio MS		
Componente	mg/L	mM
<b>Macronutriente</b>		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	67	0,50
KNO <sub>3</sub>	1250	12,35
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	14,7	0,1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	125	0,50
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,44 e 2,88	0,01 e 0,02
<hr/>		
<b>Micronutriente</b>		
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5,0	0,029
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,0	0,003
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5	0,024
KI	0,375	0,002
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,125	0,0005
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,012	*
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,012	*
<hr/>		
		μM
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .18H <sub>2</sub> O		50, 100 e 200
<hr/>		
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	-	-
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	6,95	0,05
<hr/>		