

MÁRCIA APARECIDA NOVAES GOMES

ESTUDOS IN VITRO COM A ESPÉCIE DO CERRADO:
Sinningia allagophylla (Martius) Wiehler
(GESNERIACEAE)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Márcia Aparecida Novaes
Gomes
e aprovada pela Comissão Julgadora.

03/3/99

Simone L. K. Shepherd

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

Orientador: Prof^a. Dra. Simone L. Kirszenzaft Shepherd

Campinas - SP

1999

1910-285

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	6585e
V.	Ex.
TOMBO BC/	37648
PROC.	22.9/99
C.	☐
D.	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	06/05/99
N.º CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA-UNICAMP

Gomes, Márcia Aparecida Novaes

G585e

Estudos in vitro com a espécie do cerrado: *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae)/Márcia, Aparecida Novaes Gomes. -- Campinas, SP: [s.n.], 1999. 133f: illus.

Orientadora: Simone Liliane Kirszenzaft Shepherd
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cerrado. 2. Cultivo *in vitro*. 3. Nutrientes.
4. Fitorreguladores

I. Shepherd, Simone Liliam Kirszenzaft. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

CM-00123013-1

Campinas, 03 de março de 1999

BANCA EXAMINADORA

Titulares:

Profa. Dra. Simone Liliane Kirszenzaft Shepherd (Orientadora)

Simone L. K. Shepherd

Profa. Dra. Vilma Palazetti de Almeida

Vilma Palazetti de Almeida

Profa. Dra. Linda Styer Caldas

Linda Styer Caldas

Suplente:

Prof. Dr. Pedro Roberto Furlani

Agradeço ao Arnaldo, aos meus irmãos e cunhadas; à minha mãe, tia, D. Zilda e Lúgia; à Simone, à Dulce e a todos do Departamento de Fisiologia Vegetal. Agradeço aos amigos e ofereço ao meu pai.

ÍNDICE

I-Protocolo eficiente para a obtenção de explantes da espécie do cerrado *Sinningia allagophylla* (Mart.) Wiehler (Gesneriaceae)

Resumo	1
Summary	2
Introdução	3
Material e Métodos	7
1-Material Vegetal	7
2-Método de desinfestação	8
3-Germinação e obtenção de explantes	9
Resultados e Discussão	11
Literatura Citada	15

II-Estudos de nutrição mineral *in vitro* relacionados à adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições de cerrado

Resumo	19
Summary	21
Introdução	23
Material e Métodos	27
1-Material vegetal	27
2-Estudos <i>in vitro</i>	28
2.1-Meio com diferentes valores iniciais de pH	28

2.2-Meio com diferentes concentrações de KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	29
2.3-Meios com diferentes concentrações de nutrientes, particularmente para o íon NO_3^-	30
2.4-Métodos de avaliação	30
3-Análises químicas das folhas e do solo	31
3.1-Análises do solo	31
3.1-Análises das folhas	32
Resultados	33
1-Efeito dos diferentes valores do pH inicial	33
2-Efeito das diferentes concentrações de KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	42
3-Efeito das diferentes concentrações de nutrientes particularmente para o íon NO_3^-	43
4-Análises do solo	54
5-Análises das folhas	54
Discussão	56
Literatura citada	60

III-Morfogênese e crescimento *in vitro* de *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae): efeito de nutrientes, sacarose, fitorreguladores e fotoperíodo

Abreviaturas	65
Resumo	66
Summary	69
Introdução	71

Objetivos	77
Material e métodos	78
1-Material vegetal	78
2-Condições de cultura	78
3-Métodos de avaliação	79
4-Tratamentos com diferentes combinações de fitorreguladores	80
5-Tratamentos com diferentes razões de nitrato : amônio e interações destas razões com concentrações variadas de sacarose	83
6-Tratamentos com diferentes diluições do meio B5 e de interações destas com concentrações variadas de sacarose	83
Resultados	86
1-Efeito das interações de BA e de cinetina com AIA .	86
2-Efeito das interações de BA com GA ₃	87
3-Efeito das interações de BA com CCC	88
4-Efeito das interações de BA e de cinetina com ANA .	89
5-Efeito das razões de nitrato:amônio e interações destas com concentrações variadas de sacarose	139
6-Efeito de diluições do meio B5 e das interações destas com concentrações variadas de sacarose	143
Discussão	157
Conclusão	165
Literatura citada	166

CAPÍTULO I

PROTOCOLO EFICIENTE PARA A OBTENÇÃO DE EXPLANTES DA
ESPÉCIE DO CERRRADO *Sinningia allagophylla* (Mart.)
Wiehler (GESNERIACEAE)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a obtenção de explantes para o cultivo *in vitro* da espécie nativa herbácea, *Sinningia allagophylla*, de ampla distribuição geográfica nos cerrados. Sementes coletadas de plantas crescidas em campo cerrado, na Reserva Biológica de Moji-Guaçu, São Paulo, foram desinfestadas e germinadas *in vitro*, sob condições estéreis, em meio básico de Murashige & Skoog de 1962 (MS), suplementado com sacarose 3% (p/v). Após 20 dias as sementes haviam germinado e após 40 dias as plântulas apresentavam em média $2,0 \pm 2$ cm de comprimento, todas sem raízes. Foram obtidos, a partir das plântulas, explantes de segmentos nodais de aproximadamente 0,8 cm de comprimento e com um par de folhas, os quais foram distribuídos, individualmente, em tubos de ensaio contendo 6ml de meio básico MS e utilizados posteriormente em diferentes estudos de crescimento *in vitro* da espécie.

Palavras chaves: cerrado, cultivo *in vitro*, explantes, sementes.

SUMMARY

The objective of this study was to obtain explants for *in vitro* culture of *Sinningia allagophylla*, a native herbaceous species with a wide distribution in cerrado vegetation. Seeds were collected from plants growing in cerrado in the Biological Reserve in Moji-Guaçu, São Paulo state, and were disinfected and germinated *in vitro*, under sterile conditions, in Murashige & Skoog (1962) basic medium (MS), supplemented with 3% (w/v) sucrose. After 20 days the seeds had germinated and after 40 days seedlings had a mean height of $2,0 \pm 0,2$ cm, all without roots. Nodal segment explants approximately 0,8 cm long were obtained from the seedlings and individually distributed in test tubes containing 6ml of basic MS medium and were subsequently used for *in vitro* growth studies of this species.

Key words: cerrado, *in vitro* culture, explants, seeds.

INTRODUÇÃO

Sinningia allagophylla (sinonímia *Rechsteineria spicata*) é uma planta herbácea de caule ereto, simples, piloso, nascendo de um a vários ramos de um grande órgão subterrâneo; suas folhas são pilosas, opostas duas a duas; as flores pequenas, tubulosas, de corola cor-de-abóbora, ficam reunidas em cachos terminais de 25-30 cm de comprimento e o fruto em cápsula oblonga (Ferri, 1969). É uma espécie nativa encontrada nos estados de Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul; com ampla distribuição nas regiões do cerrado. Encontrada também no Paraguai, Argentina e Uruguai (Chautems, 1993).

Estudos realizados por Almeida (1994) mostraram tratar-se de uma espécie perene com ciclo anual, perdendo sua parte aérea nas estações secas (inverno e outono) e rebrotando, a partir de gemas de seu órgão subterrâneo, na primavera.

O gênero *Sinningia* é conhecido por seu potencial ornamental, sendo as espécies deste gênero bastante procuradas por colecionadores de vários países e pessoas interessadas em plantas ornamentais. Além desta importância econômica, há a importância ecológica, pelo fato de sua floração ser apreciada por beija-flores, os quais são os polinizadores deste gênero (Palazzo & Both, 1993). Este gênero possui um grande órgão subterrâneo de onde partem os ramos, tendo sido evidenciado no

órgão subterrâneo de *S. allagophylla* altos conteúdos de açúcares, o que torna esta espécie interessante para estudos ecofisiológicos e bioquímicos (Figueiredo-Ribeiro et al. 1986).

O cerrado é um ecossistema formado por um mosaico de diferentes tipos de vegetação e que refletem a diversidade de climas, de solos e da topografia presente nesta vasta área. Os fatores ambientais: solo deficiente de nutrientes, ácido e com altos teores do íon alumínio; a presença constante do fogo e a variação estacional característica, com uma estação quente e chuvosa, favorecendo o crescimento das espécies, alternada com uma estação desfavorável, de inverno seco e tépido (Goodland, 1979), são fatores determinantes deste ecossistema (Assad, 1996). Estas condições adversas, ao longo do tempo, determinaram estratégias adaptativas que tornaram a vegetação do cerrado com características próprias que as diferenciam das vegetações de outros ecossistemas.

A necessidade de maior produção de alimentos com o aumento da população mundial, tem estabelecido grandes empreendimentos agrícolas nas regiões do cerrado, pois este se constitui a maior fronteira agrícola contínua que o planeta possui, com uma extensão de 2.100.000 km². Além da conversão nativa em áreas agrícolas há também o extrativismo que tem garantido a subsistência de camadas populacionais significativas (Ribeiro & Silva, 1996). Segundo Resk (1996) é possível tornar este ecossistema em um ecossistema manejado, com produção de grãos,

carne, fibras, madeira e energia, mantendo-se áreas destinadas à preservação.

A importância econômica e ecológica do ecossistema do cerrado tem tido um reconhecimento cada vez maior nas últimas décadas, estimulando pesquisas voltadas para o melhor conhecimento das estratégias adaptativas das espécies, propagação destas e recuperação de áreas do cerrado (Medina, 1993). Para a realização de tais pesquisas são importantes os estudos básicos de eco-fisiologia, bioquímica e de biotecnologia, com a micropropagação de espécies nativas (Zaidan & Ribeiro, 1995).

As técnicas de cultivo *in vitro* têm tido um papel cada vez maior nos últimos trinta anos, em estudos biológicos, na micropropagação de espécies vegetais, conservação de germoplasmas e na produção de substâncias bioquímicas das plantas, incluindo enzimas e metabólitos secundários (Allan, 1993). Também têm sido utilizadas em programas de preservação de espécies selvagens, desenvolvidos em institutos e jardins botânicos de vários países (Fay, 1992).

O cultivo *in vitro* de *S. allagophylla* tem importância por tratar-se de uma espécie amplamente distribuída no Brasil e adaptada às condições do cerrado, sendo poucos os estudos *in vitro* realizados com espécies selvagens nativas, ficando estes mais voltados para as espécies de potencial econômico agrícola e para algumas espécies ornamentais.

A espécie citada, como outras herbáceas nativas do cerrado, pode se reproduzir por sementes, mas 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. A propagação vegetativa por fragmentos do órgão subterrâneo não pareceu ser possível (Almeida & Shepherd, 1998). Com a micropropagação pode-se obter, em um curto espaço de tempo, material vegetal suficiente para a realização de estudos. com a elaboração de protocolos do crescimento e da morfogênese *in vitro* desta espécie, bem como estudos das estratégias adaptativas que apresenta como espécie do cerrado.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de se obter explantes de *S. allagophylla*, livres de patógenos, a partir de plântulas resultantes da germinação *in vitro*, em condições assépticas.

MATERIAL E MÉTODOS

1-Material vegetal

Sementes da espécie *S. allagophylla* foram colhidas de plantas crescidas em área de campo cerrado, setor destinado a pesquisa não perturbatória, da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (SP-22°15-16'S e 47°8-12'W, 585-635m de altitude) no Estado de São Paulo. As plantas a partir das quais foram feitas a coleta formavam uma população de oito indivíduos distribuídos em duas áreas, cada uma de 5-10m², separadas por uma distância de 20-30 m.

As sementes foram colhidas no início do mês de dezembro, de diferentes frutos distribuídos em cinco plantas. Neste período os frutos se encontravam secos e a dispersão das sementes pelo vento já havia iniciado, com poucos frutos ainda com sementes e estas em pequeno número. Após a colheita as sementes foram colocadas em frascos escuros e no dia seguinte foram desinfestadas e inoculadas em meio nutritivo para germinação; as não utilizadas foram mantidas sob refrigeração (temperatura próxima à 10°C).

2-Método de desinfestação

A desinfestação das sementes foi realizada em capela de fluxo laminar em condições assépticas, utilizando vidraria e pinças previamente esterilizadas. As sementes, por serem bastantes pequenas, foram acondicionadas em um saquinho de pano, amarrado levemente com linha.

Os seguintes passos e soluções foram utilizados:

- 1- Os saquinhos contendo as sementes foram imersos na solução fungicida Benlate 1% (p/v), sendo mantidos nesta solução por 10 min sob agitação.
- 2- Em seguida a solução fungicida foi substituída por solução de etanol 70% onde o saquinho permaneceu por 20 min.
- 3- Com a retirada do etanol foi colocado no mesmo béquer a solução de hipoclorito de sódio 1% (p/v) com 1 gota de Tween-20, ficando as sementes nesta imersão por 12 min sob agitação.
- 4- Em seguida da retirada do hipoclorito de sódio, foram realizadas três lavagens em água destilada estéril e as sementes foram então retiradas dos saquinhos e colocadas para secar em papel de filtro estéril, em placa de Petri, por 3 h.

3-Germinação e obtenção de explantes

As sementes esterilizadas foram colocadas em cinco frascos de vidro com 9 cm de altura e 8 cm de diâmetro, contendo 20 ml do meio básico MS, no estado sólido e suplementado com sacarose 3% (p/v) (em torno de 90-100 sementes em cada frasco). O pH do meio foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem em 120°C por 20 minutos.

Os frascos com as sementes foram mantidos em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luminosidade constante fornecida por duas lâmpadas fluorescentes e após quarenta dias da inoculação das sementes no meio MS, das plântulas resultantes da germinação, foram obtidos explantes nodais de 0,8 cm de comprimento com duas folhas. Os explantes foram transferidos, isoladamente, para tubos de ensaios de fundo chato com 8 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, contendo 6 ml do meio básico MS no estado sólido e suplementado com sacarose 3% (p/v).

As plântulas escolhidas para a obtenção dos explantes foram as que apresentavam caule e folhas mais espessos, tendo sido eliminadas as que possuíam estes órgãos muito delgados, assim, mais frágeis. Ao total obteve-se das plântulas em torno de 500 explantes.

Os explantes foram mantidos em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luminosidade constante fornecida por duas lâmpadas fluorescentes durante dois meses. A partir deste período foram

utilizados como material vegetal para a realização de estudos do crescimento *in vitro* da espécie. Uma fonte constante de explantes foi mantida, através de repiques, nas mesmas condições de cultivo dos primeiros, acima citadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Levantamentos realizados por Ferri (1961), citados por Goodland (1979), de estudos experimentais da germinação de sementes das plantas do cerrado, indicaram que sementes de inúmeras plantas apresentavam altas taxas de germinação, com mesmo 100% de germinação em certas amostras. O resultado obtido por nós na germinação das sementes de *S. allagophylla* indicou este caráter observado nas espécies do cerrado, pois embora não tenha sido quantificado o número exato de sementes colocadas para germinar, a germinação, após vinte dias da inoculação das sementes no meio nutritivo, ocorreu em torno de 100%, não tendo sido encontradas sementes no meio dos diferentes frascos quando as plântulas foram retiradas para a obtenção de explantes.

A protrusão do embrião da semente é um dos passos principais e de maior dificuldade no processo da germinação, sendo a radícula o órgão de protrusão mais comum, mas em algumas espécies é o cotilédone e em outras o hipocótilo (Berlyn, 1972). A germinação da semente pode ser modificada por fatores ambientais atuando durante o desenvolvimento e a maturação, por exemplo, a temperatura, luz, oxigênio e água (Guterman, 1993).

A germinação ocorrida no meio MS no estado sólido, utilizado neste experimento, foi anômala, pois não ocorreu a protrusão da radícula. Em sementes não estéreis, colocadas

sobre papel de filtro úmido em placa de Petri, ocorreu a protrusão da radícula. Para este trabalho a germinação foi considerada com a protrusão da plúmula.

A não protrusão da radícula, segundo Válio (comunicação pessoal, 12/98), pode ter ocorrido devido a hipoxia neste meio sólido. Shepherd (comunicação pessoal, 12/98) esclarece que a presença de hormônios e de fitorreguladores no meio nutritivo pode levar a não protrusão radicular, como o fitorregulador 6-benzilaminopurina (BA) que causou esta germinação anômala em sementes de tomate. No presente trabalho não foram utilizadas tais substâncias no meio nutritivo, mas outros fatores podem ter ocorrido impedindo a protrusão da radícula, como talvez a osmolaridade do meio, pois a pressão osmótica do meio, determinada por macronutrientes e açúcares, pode inibir o crescimento e a formação de órgãos como resultado da não entrada de água (Pierik, 1987). Segundo Almeida (comunicação pessoal, 25/01/1999), o processo de esterilização das sementes, pode ter causado dano no tecido meristemático da região apical da radícula, impedindo a sua protrusão.

As sementes têm sido preferencialmente utilizadas como fonte para material de micropropagação por permitir que variabilidade genética seja mantida, entretanto em algumas espécies as sementes não são disponíveis e outros órgãos vegetais podem ser utilizados, como gemas apicais e laterais e mesmo folhas e raízes (Fay, 1992). Nos estudos *in vitro*

realizados por Almeida (1994) com *S. allagophylla*, os explantes foram obtidos de gemas laterais de plantas crescidas em casa de vegetação; tais explantes apresentaram um estabelecimento *in vitro* eficiente tendo sido utilizados em estudos realizados pela autora.

Para este trabalho, foram escolhidas as sementes como fonte de material para os estudos *in vitro* da espécie, porque a obtenção de explantes a partir de plântulas apresentam algumas vantagens, como a maior disponibilidade de explantes sem contaminação e a pronta capacidade de crescimento e resposta à aplicação de fitorreguladores, permitindo, assim, a condução de vários testes de meios nutritivos e condições ambientais (Grattapaglia & Machado, 1990).

O método aqui descrito para a obtenção dos explantes de *S. allagophylla*, a partir de plântulas resultantes da germinação *in vitro*, foi eficiente, pois houve alta taxa de germinação, obtendo-se um grande número de explantes. Embora tenha sido uma germinação anômala, sem a protrusão da radícula, as plântulas foram viáveis e os explantes, obtidos de segmentos nodais das plântulas e transferidos, isoladamente, para tubos de ensaios contendo meio básico MS, foram 100% viáveis. Os explantes neste meio formaram raízes adventícias curtas e em pequeno número.

Outro dado que torna este método eficiente para a obtenção de explantes e que faz de *S. allagophylla* uma espécie apropriada para estudos de crescimento *in vitro*, é o fato de

não ter ocorrido problemas freqüentes como a contaminação por microrganismos endógenos que aparecem posteriormente nos explantes e a liberação de compostos fenólicos durante o isolamento do explante. Algumas espécies, especialmente as tropicais, contém altas concentrações de substâncias fenólicas que são oxidadas no momento da obtenção do material. Esta oxidação faz com que o explante isolado torne-se com coloração escura, ocorrendo a paralisação de seu crescimento (Hu & Wang, 1983).

Explantes desta espécie, obtidos das gemas laterais por Almeida (1994), apresentaram a oxidação e, assim, houve a necessidade de serem mergulhados em solução antioxidante.

LITERATURA CITADA

- Almeida, V.P., 1994. Tuberização em *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae), uma espécie do cerrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, tese de doutorado.
- Almeida, V.P. & Shepherd, S.L.K. 1998. *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae): cultivation *in vitro* of a native plant of Brazilian cerrado. Revta brasil. Bot. (no prelo).
- Assad, M.L.C.C.L., 1996. Recursos biológicos: ocorrência e variabilidade. In: VIII Simpósio Sobre o Cerrado, Brasília, Brasil, anais, p.20-24.
- Berlyn, G.P., 1972. Seed germination and morphogenesis. In: Seed Biology (T.T. Kozlowski, ed), Academic Press, New York, p.223-312.
- Chautems, A. 1993. Gesneriaceae. In: Flora del Paraguay (R. Spichiger & B. Bocquet, eds), Conserv. Jad. Bot. Genève, 22, p.41.
- Fay, M.F., 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. In Vitro Cell Dev. Biol. 28P:1-4.
- Ferri, M.G., 1969. Plantas do Brasil - Espécies do Cerrado. Ed Edgard Blicher/EDUSP, São Paulo.
- Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Dietrich, S.M.C., Chu, E.P., Carvalho, M.A., Vieira, C.C.J. & Graziano, T.T., 1986.

Reserve carbohydrates in underground organs of native Brazilian plants. *Revta brasil. Bot.* 9:159-166.

Goodland, R., 1979. Análise ecológica da vegetação do cerrado.

In: *Ecologia do Cerrado* (R. Goodland & M.G. Ferri, eds), EDUSP, São Paulo, p.61-160.

Goodland, R., 1979. Estudos sobre a ecologia da vegetação do cerrado. In: *Ecologia do Cerrado* (R. Goodland & M.G. Ferri, eds), EDUSP, São Paulo, p.13-20.

Grattapaglia, D. & Machado, M.A., 1990. Micropropagação. In: *Técnicas e Aplicações da Cultura de Plantas* (A.C. Torres & L.S. Caldas, eds), ABCTP/EMBRAPA-CNPH, Brasília, p.99-169.

Guttermann, Y., 1993. Maternal effects on seeds during development. In: *Seeds - The Ecology of Regeneration in Plant Communities* (M. Fenner, ed), CAB INTERNATIONAL, Wallingford, p.27-60.

Hu, C.Y. & Wang, P.J., 1983. Meristem, shoot tip, and bud cultures. In: *Handbook of Plant Cell Culture* (D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato & Y. Yamada, eds), vol 1, Macmillan, New York, p.177-227.

Medina, E., 1993. Mineral Nutrition: Tropical Savanas. *Progress in Botany* 54:236-251.

Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

- Pallazzo Junior, J.T. & Both, M.C., 1993. Gesneriáceas. In: Flora Ornamental Brasileira- um guia para o paisagismo ecológico (SAGRA-DC LUZZATO, eds), Porto Alegre, p.121-123.
- Pierik, R.L.M., 1978. Preparation and composition of nutrient media. In: *In Vitro Culture of Higher Plants* (R.L.M. Pierik, ed), Martius Nijhoff Publisher, Dordrecht, p.45-81.
- Resck, D.V.S., 1996. Manejo de solos e sustentabilidade dos sistemas agrossilvipastoril na região dos Cerrados. In: VIII Simpósio Sobre o Cerrado, Brasília, Brasil, anais, p.81-90.
- Ribeiro, J.F.R. & Silva, J.C.S., 1996. Manutenção e recuperação da biodiversidade do bioma Cerrado: o uso de plantas nativas. In: VIII Simpósio Sobre o Cerrado, Brasília, Brasil, anais, p.10-14.
- ZAIDAN, L.R.P. & RIBEIRO, R.C.F. 1995. Aproveitamento econômico de espécies nativas. In: Workshop Bases para a Conservação e Uso Sustentável das Áreas de Cerrado do Estado de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brasil, relatório, p.47.
-

CAPÍTULO II

ESTUDOS DE NUTRIÇÃO MINERAL IN VITRO RELACIONADOS À
ADAPTAÇÃO DE *Sinningia allagophylla* (Martius)
Wiehler (GESNERIACEAE) ÀS CONDIÇÕES DE CERRADO

RESUMO

Os estudos *in vitro* foram realizados a partir de sementes colhidas de *S. allagophylla*, crescidas em campo cerrado, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, em Moji-Guaçu, SP. Foram testados *in vitro* duas interfaces da adaptação de uma planta às condições do cerrado: efeito dos valores do pH e da concentração de certos nutrientes, notadamente fósforo, magnésio e nitrogênio. Para tanto os explantes foram mantidos *in vitro* em: (a) meio básico de Murashige & Skoog de 1962 (MS), no estado líquido, em um gradiente de valores de pH iniciais, indo do valor 4,2 ao 5,8, em intervalos de 0,2; (b) meio MS no estado líquido, com valor inicial de pH 4,4 e concentrações progressivamente menores de KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, com 1,25 mmol. l^{-1} de KH_2PO_4 e 3,1 mmol. l^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100% em relação ao meio MS), 0,125 mmol. l^{-1} de KH_2PO_4 e 0,31 mmol. l^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (concentração foi reduzida em 10 vezes em relação ao meio MS), 0,0125 de KH_2PO_4 e 0,031 mmol. l^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (concentração foi reduzida em 100 vezes em relação ao meio MS) e ausência total destes nutrientes; (c) meio MS no estado sólido em concentrações progressivamente menores de KNO_3 e em valor inicial de pH 4,8, nas concentrações de 18,81 mmol. l^{-1} (100% em relação ao meio MS), 9,40 mmol. l^{-1} (50% em relação ao meio MS) e 4,70 mmol. l^{-1} (25% em relação ao meio MS) e (d) concentrações nutricionais totais em relação ao

meio Gamborg *et al.* de 1968 (meio B5) e reduzida à metade (B5 50%), em pH inicial 4,8. Os explantes foram cultivados *in vitro* por 90 dias em luminosidade constante, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes e a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O melhor crescimento para todos os parâmetros avaliados fora obtido em valores iniciais mais baixos de pH e em concentrações de nutrientes menores que as dos meios padrões (MS e B5). Estes resultados são consistentes com o conceito de uma planta bem adaptada em absorver nutrientes de solos do cerrado, solos estes ácidos, pobres em nutrientes e ricos em alumínio. O que é corroborado pelas análises químicas do solo e do material vegetal crescido no cerrado, onde foi realizada a coleta.

Palavras chaves - cultivo *in vitro*, pH ácido, alumínio.

SUMMARY

In vitro studies on *S. allagophylla* were carried out using, as a starting material, seeds collected from wild plants growing in "campo cerrado" vegetation at the Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, SP Brazil. Two interfaces of plant adaptation to cerrado conditions were tested *in vitro*: effect of pH and the concentration of certain nutrients, mainly phosphorus, magnesium and nitrogen. Explants were maintained *in vitro* in (a) basic Murashige & Skoog 1962 medium (MS), in liquid form with a gradient of initial pH values ranging from 4.2 to 5.8 at 0.2 pH unit intervals; (b) liquid MS medium, with initial pH value 4.4 and progressively lower concentrations of KH_2PO_4 and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, with 1.25 mmol. l^{-1} of KH_2PO_4 and 3.1 mmol. l^{-1} of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100% of MS medium), 0.125 mmol. l^{-1} of KH_2PO_4 and 0.31 mmol. l^{-1} of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 times reduction of MS), 0.0125 mmol. l^{-1} of KH_2PO_4 and 0.031 mmol. l^{-1} of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100 times reduction of MS) and total absence of these nutrients; (c) solid MS medium with initial pH of 4.8 and progressively lower concentrations of KNO_3 at 18.81 mmol. l^{-1} (100% of MS), 9.40 mmol. l^{-1} (50% of MS) and 4.70 mmol. l^{-1} (25% of MS) and (d) Gamborg *et al.* 1968 medium (B5 medium) with initial pH 4.8 and standard or half-strength nutrients. Explants were cultivated for 90 days *in vitro* constantly illuminated by two fluorescent lamps at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Greatest *in*

vitro growth for all parameters measured was obtained at lower initial pH values and at lower nutritional concentrations when compared to standard culture medium as MS and B5. These results are consistent with a plant well adapted to absorb nutrients from acid, nutrient poor, cerrado soils with high aluminium concentrations as shown by chemical analyses of field-grown material and of the surrounding soil.

Key words - *in vitro* culture, acid pH, aluminium.

INTRODUÇÃO

O cerrado constitui-se na segunda maior formação vegetal brasileira, depois da Floresta Amazônica, abrangendo aproximadamente 25% do território brasileiro, ou seja, cerca de 2 milhões de km² (Ratter & Ribeiro, 1996). Apesar da alta acidez e baixa fertilidade dos solos sob cerrado, este ecossistema está ameaçado por constituir a principal fronteira agropecuária do Brasil, em razão de sua proximidade dos centros consumidores, pela topografia plana, facilitando sua mecanização e pela estrutura viária satisfatória, compensando assim o investimento requerido para o estabelecimento de culturas (Ker et al., 1992).

A ocupação do cerrado pelo setor agropecuário, somada ao acentuado extrativismo, concorre para o processo de extinção de espécies, com a perda da ampla biodiversidade de que é formado e que não é completamente conhecida. Estudos revelam que o cerrado apresenta um grande potencial econômico nas áreas de: alimentos - espécies vegetais que fornecem frutos, sementes, tubérculos, palmito, chás, óleos e gorduras; industriais - fornecimento de fibras, cortiça, gomas, resinas e látex; uso medicinal - mais de cem espécies conhecidas para tratamentos e curas; e riqueza em plantas com elevado potencial ornamental (Yexküll & Mutert, 1995).

A vegetação do cerrado apresenta características próprias que a individualiza dos outros tipos de vegetação e tem sido sugerida à importância dos estudos básicos de eco-fisiologia, bioquímica e de biotecnologia, com a micropropagação de espécies nativas, para um melhor entendimento dos mecanismos de adaptação destas (Zaidan & Ribeiro, 1995). A qualidade do solo do cerrado, função de sua origem geológica, é o fator que determina o tipo de vegetação, sendo este solo submetido a intenso intemperismo e lixiviação, o que o torna um solo ácido, pobre em nutrientes e com teores altos de íons alumínio. A toxicidade do íon alumínio pode ser um dos fatores mais importantes limitando o crescimento das plantas em tais solos (Goodland, 1979). Na planta, o alumínio causa a inibição do seu crescimento, provavelmente por impedir o influxo de minerais, como o cálcio, magnésio e fosfato ou por afetar diretamente a planta com a inibição do crescimento da raiz, sendo considerado o ápice da raiz o sítio da toxicidade do íon alumínio (Meharg, 1994).

Estudos realizados por Haridasan (1987) com espécies nativas do cerrado identificaram algumas como acumuladoras do íon alumínio (acumulando mais de 1000 mg/kg), através da análise da concentração do íon alumínio e outros elementos em suas folhas. Tais plantas demonstraram que as altas concentrações do íon alumínio em suas folhas não estão associadas com o baixo nível de outros íons, indicando que as

espécies acumuladoras de alumínio superam a interferência e eliminam os efeitos do alumínio e que possuem um mecanismo eficiente para a absorção de nutrientes do solo. Vários mecanismos foram propostos para a resistência de plantas ao íon alumínio e tem sido bem documentado que muitas espécies apresentam variabilidade genética significativa em sua habilidade para resistir à toxicidade pelo íon alumínio, sendo esta resistência geralmente um traço dominante (Larsen et al., 1998).

Sinningia allagophylla, espécie da família Gesneriaceae, é uma planta herbácea nativa de ampla distribuição nos cerrados, apresentando caracteres que são considerados comuns aos de plantas adaptadas às condições do cerrado, com o caule ereto, simples, piloso, nascendo de um a vários ramos de um órgão subterrâneo; as folhas são resistentes, com inervação proeminente e as flores reunidas em cachos terminais com a corola cor-de-abóbora (Ferri, 1969). Estudos fenológicos realizados por Almeida (1994), mostraram que a espécie *S. allagophylla* é uma planta perene com ciclo anual, que cresce, floresce e, em seguida, tem um gradual declínio, resultando na perda de sua parte aérea durante as estações secas (outono e inverno). As gemas dormentes permanecem nos órgãos subterrâneos, com o brotamento ocorrendo quando as condições se tornam favoráveis (na primavera).

A espécie citada respondeu favoravelmente às condições de cultivo *in vitro* (Almeida & Shepherd, 1998), obtendo-se material vegetal, independente da época do ano, para a realização de estudos eco-fisiológicos e, assim, a elaboração de protocolos do crescimento *in vitro* desta, como uma espécie adaptada às condições do cerrado.

O objetivo do presente trabalho foi o estudo *in vitro* da adaptação da espécie *S. allagophylla* aos fatores nutricionais, tais como valores do pH e composição do meio, para embasamento do conhecimento dos mecanismos de adaptação, bem como aperfeiçoar-se o protocolo de micropropagação desta espécie do cerrado.

MATERIAL E MÉTODOS

1-Material Vegetal

O material botânico utilizado nos estudos (sementes e folhas) foi coletado de plantas crescidas em área de campo cerrado, setor destinado a pesquisa não perturbatória, da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (SP-22°15-16'S e 47°8-12'W, 585-635 m de altitude) no Estado de São Paulo.

As folhas foram coletadas no período de dispersão das sementes, ou seja, um período anterior ao da senescência das plantas. A coleta foi realizada neste período devido a necessidade de esperar a floração, para a obtenção de sementes. Amostra local do solo foi coletada em 20 cm abaixo da superfície do solo.

A primeira abordagem do estudo da adaptação de *S. allagophylla* foi feita *in vitro* com a observação do efeito dos valores de pH do meio e uma segunda abordagem com o estudo nutricional *in vitro*. Para uma visão eco-fisiológica mais ampla da adaptação foram feitos no material crescido *in situ* determinações de nutrientes presentes, tanto nas folhas de plantas crescidas no cerrado, como da amostra do solo do local.

2-Estudos *in vitro*

Explantes da espécie *S. allagophylla*, obtidos assepticamente a partir das sementes coletadas de plantas crescidas na reserva citada, foram cultivados *in vitro* em meio de cultura básico MS, com pH 5,8, suplementado com sacarose 3% (p/v) e mantidos durante dois meses em tubos de ensaio de fundo chato com 8 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, contendo 6 ml do meio, em luminosidade constante fornecida por duas lâmpadas fluorescentes e a uma temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A partir destes obteve-se explantes com 0,8 cm de comprimento, com um par de folhas e sem a gema apical, para estudos do efeito de diferentes valores de pH do meio e de diferentes concentrações de nutrientes sobre os parâmetros: comprimento do eixo principal, número e comprimento das raízes, número de folhas e expansão foliar.

2.1-Meio com diferentes valores iniciais de pH

Explantes foram cultivados assepticamente durante 90 dias em meio básico MS em estado líquido, suplementado com sacarose 3% (p/v), sobre suporte de papel de filtro Whatman nº 1, num gradiente de valores iniciais do pH. Os valores iniciais de pH do meio foram ajustados variando do pH 4,2 ao pH 5,8, em intervalos de 0,2, totalizando nove tratamentos, com cinco

repetições cada. A observação da mudança nos valores de pH inicial foi possível graças a presença do indicador verde bromocresol (5 ml/l) adicionado ao meio quando do seu preparo.

2.2-Meio com diferentes concentrações de KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Explantos foram cultivados assepticamente durante 90 dias em meio MS no estado líquido e suplementado com sacarose 3% (p/v), utilizando-se como suporte papel de filtro Whatman nº 1, em pH 4,4 e com diferenças nas concentrações de KH_2PO_4 e de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, totalizando dezesseis tratamentos (tabela 1) com cinco repetições de cada um.

Tabela 1. Tratamentos com diferentes concentrações de KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

MgSO_4 (mmoles.l ⁻¹)	KH_2PO_4 (mmoles.l ⁻¹)			
	1,25	0,125	0,0125	0,0
3,1	1	5	9	13
0,31	2	6	10	14
0,031	3	7	11	15
0,0	4	8	12	16

2.3-Meio com diferentes concentrações de nutrientes, particularmente para o íon NO_3^-

Explantes foram inoculados em meios no estado sólido com pH 4,8 e suplementado com sacarose 3% (p/v), totalizando cinco tratamentos com cada um apresentando cinco repetições: meio MS (tratamento 1), MS com $\frac{1}{2}$ de KNO_3 (tratamento 2), MS com $\frac{1}{4}$ de KNO_3 (tratamento 3), B5 (tratamento 4) e B5 50% (tratamento 5). O pH 4,8 foi escolhido por ser um pH mais ácido e permitir a geleificação do meio.

2.4-Métodos de avaliação

Nos resultados obtidos, após 90 dias, em todos os parâmetros observados, calculou-se a média, desvio padrão e análise de variância (ANOVA), entre os tratamentos e dentro dos tratamentos (teste VARPC, elaborado pelo Prof. Dr. Ladaslav Sodek, do Depto de Fisiologia Vegetal, IB/Unicamp).

O critério utilizado para a obtenção dos dados foi o uso de classes indicando um intervalo de valores, exceto para o comprimento do eixo principal:

-Classes dos valores dos parâmetros número de raízes, número e de folhas- 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=mais de 15.

-Classes dos valores do comprimento das raízes- 1=0,0cm
2=0,1 a 1,0cm; 3=1,0 a 2,0cm; 4=2,0 a 3,0cm; 5=3,0 a 4,0cm.

-Classes dos valores da expansão foliar- 1=pouca expansão
(área de 9-38mm²); 2=média expansão (38-66mm²) e 3=grande
expansão (66-94mm²).

-Classes dos valores da porcentagem de clorose- 1=0%; 2=5 a
10%; 3=10 a 20%; 4=20 a 50%; 5=50 a 70% e 6=70 a 100%.

3-Análise químicas das folhas e do solo

Para a análise química da planta foram utilizadas as folhas por serem elas os órgãos que refletem o melhor estado nutricional da planta (Malavolta et al., 1997). Os métodos utilizados para a análise foliar exige uma quantidade mínima de 100 g de matéria seca para ser efetiva, o que inviabiliza a análise do material vegetal cultivado *in vitro*. As análises do solo e das folhas foram realizadas no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Seção de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas.

3.1-Análise do solo

A análise dos teores da matéria orgânica e dos nutrientes da amostra do solo foi realizada através de métodos de rotina

do Centro de Solos e Recursos Agroambientais do IAC (Raij et al., 1987).

Foram utilizados extratores, como a resina para o P, K, Ca e Mg; água quente para o B (Abreu et al., 1994); solução complexante DTPA para o Zn, Fe, Cu e Mn (Lindsay & Norvell, 1978) e o extrator KCl para o Al. A determinação dos teores destes nutrientes foi dada por métodos espectrométricos e o valor do pH foi determinado em solução CaCl_2 0,1M.

3.2-Análise das folhas

Após a lavagem, secagem e moagem das folhas verdes, os extratos para a determinação dos teores dos elementos foram obtidos através da digestão pelo ácido perclórico, com extração separada para o N, por digestão sulfúrica, e para o Al, por digestão seca (incineração) (Bataglia et al., 1983). Para a determinação dos teores dos elementos foi utilizada a espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio (ICP-AES).

RESULTADOS

1-Efeito dos diferentes valores do pH inicial

Os valores de pH do meio nos diferentes tratamentos sofreram alterações durante os 90 dias de cultivo, com uma tendência à diminuição já nos primeiros 15 dias de cultivo. As diferenças nos valores finais foram significativas ao nível de 0,1% (Duncan 5%) para os tratamentos 3 e 8, que apresentavam valores iniciais do pH em 4,6 e 5,8 e após os 90 dias passaram a 4,0 e 5,1, respectivamente. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre eles, com os valores finais de pH variando entre 4,2 e 4,6 (figura 1).

Os diferentes valores do pH não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros analisados, entretanto observou-se uma tendência para valores mais altos, em todos os parâmetros, nos tratamentos 3, 4, 5 e 6, estes com valores iniciais do pH em 4,6, 4,8, 5,0 e 5,2 e finais em 4,0, 4,2, 4,4 e 4,4, respectivamente, com diferenças mais evidentes nos explantes cultivados no tratamento 3 (figura 2) para o comprimento do eixo principal (figura 3), número e comprimento das raízes (figura 4), número de folhas e expansão foliar (figura 5).

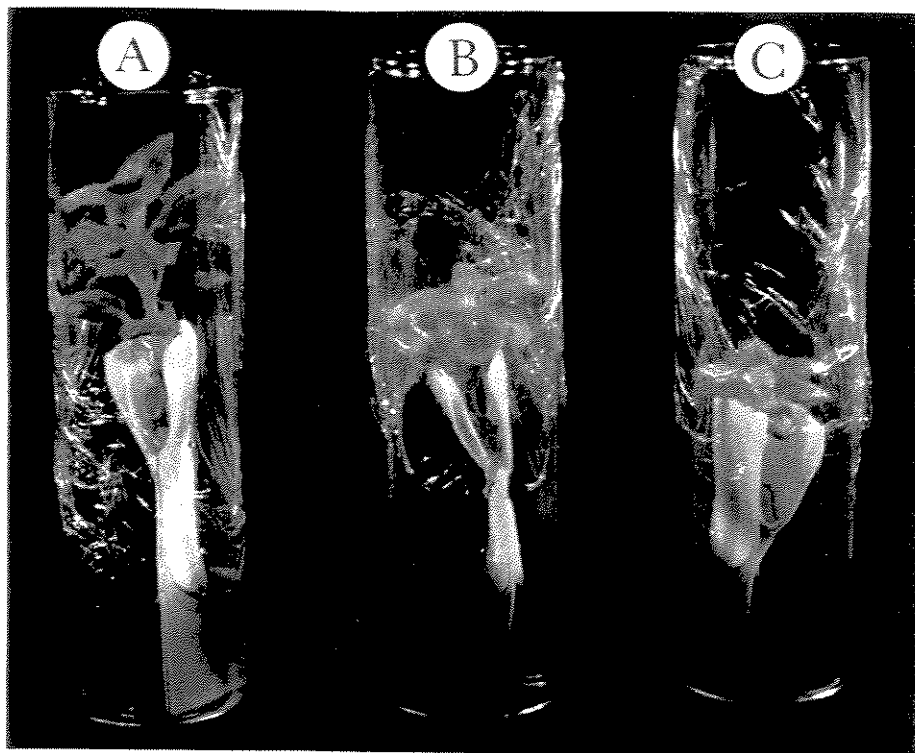


Figura 2. Explantes de *S. allagophylla* após serem cultivados *in vitro* em meio MS, por 90 dias, com diferentes valores iniciais do pH: (A) valor inicial 4,6 e final (após 90 dias) em 4,2; (B) valor inicial 5,0 e final 4,6 e (C) valor inicial 5,8 e final 5,6.

Figura 1. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: valores de pH do meio após 90 dias de cultivo (médias e respectivos desvios padrões). Os valores iniciais do pH do meio foram ajustados inicialmente em gradiente de pH (4,2 ao 5,8) com intervalos de 0,2. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan). Cultivo em luminosidade constante, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes e a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Figura 3. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito dos valores iniciais de pH do meio sobre o parâmetro comprimento do eixo principal, após 90 dias de cultivo (médias e respectivos desvios padrões). Diferenças não foram significativas entre os tratamentos, com uma tendência para maiores valores do parâmetro no tratamento 3.

Valores iniciais do pH do meio:		
4,2	4,8	5,4
4,4	5,0	5,6
4,6	5,2	5,8

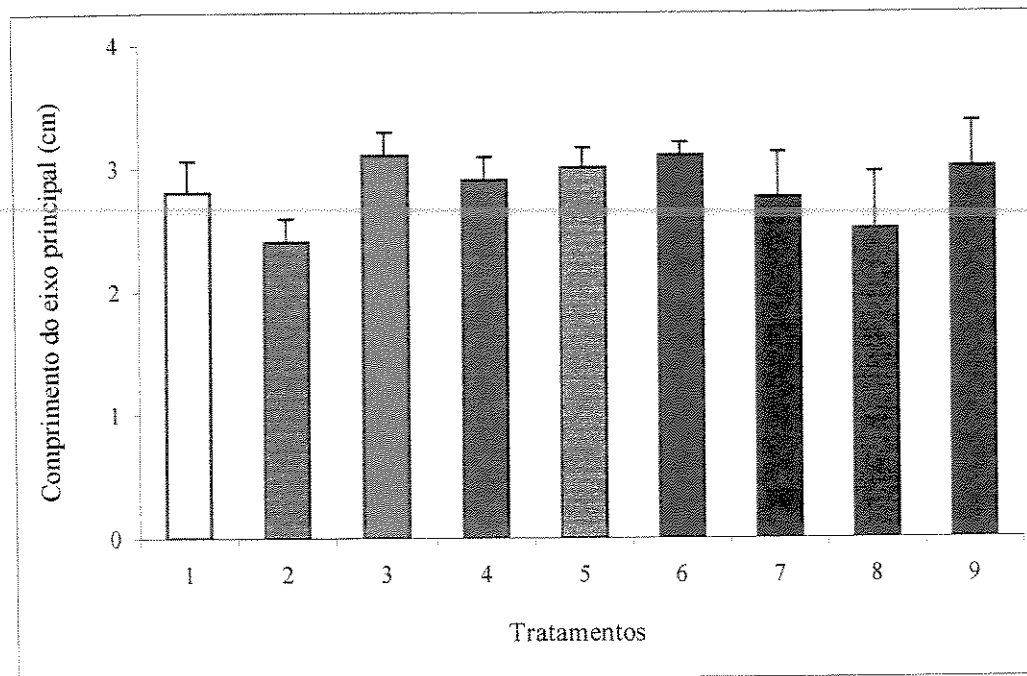
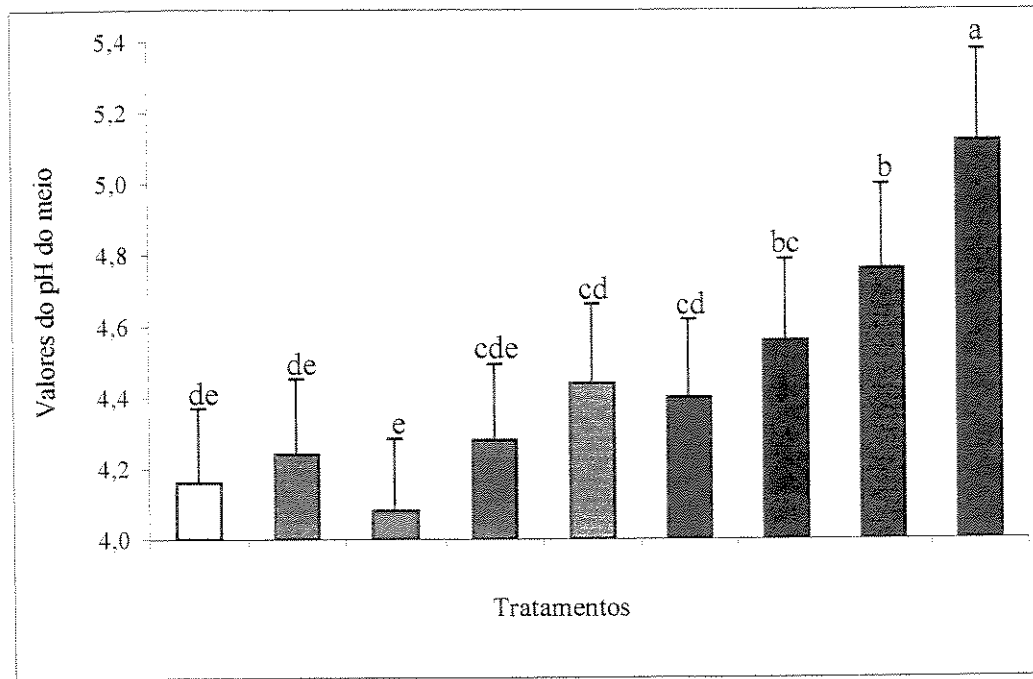


Figura 4. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito dos valores iniciais de pH do meio sobre os parâmetros número (a) e comprimento das raízes (b), após 90 dias de cultivo (médias e respectivos desvios padrões). Classes dos valores dos parâmetros: número de raízes - 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=acima de 15 raízes e comprimento das raízes - 1=0,0cm; 2=0,1 a 1,0cm; 3=1,0 a 2,0cm; 4=2,0 a 3,0cm; 5=3,0 a 4,0cm. Diferenças não foram significativas entre os tratamentos, com uma tendência para maiores valores dos parâmetros no tratamento 3.

Valores iniciais do pH do meio:		
4,2	4,8	5,4
4,4	5,0	5,6
4,6	5,2	5,8

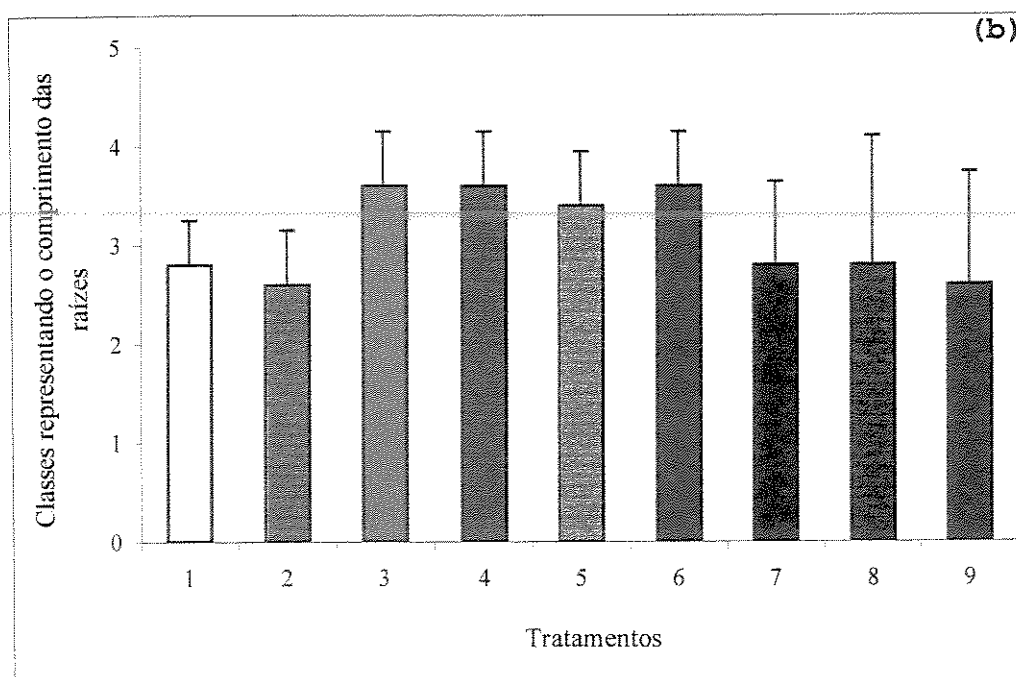
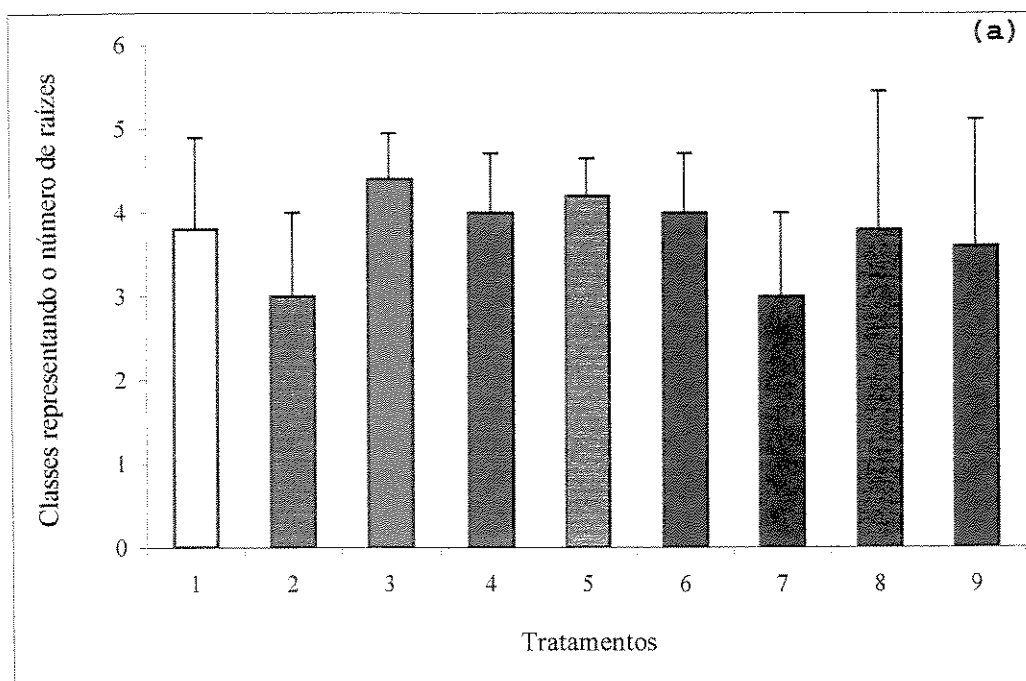
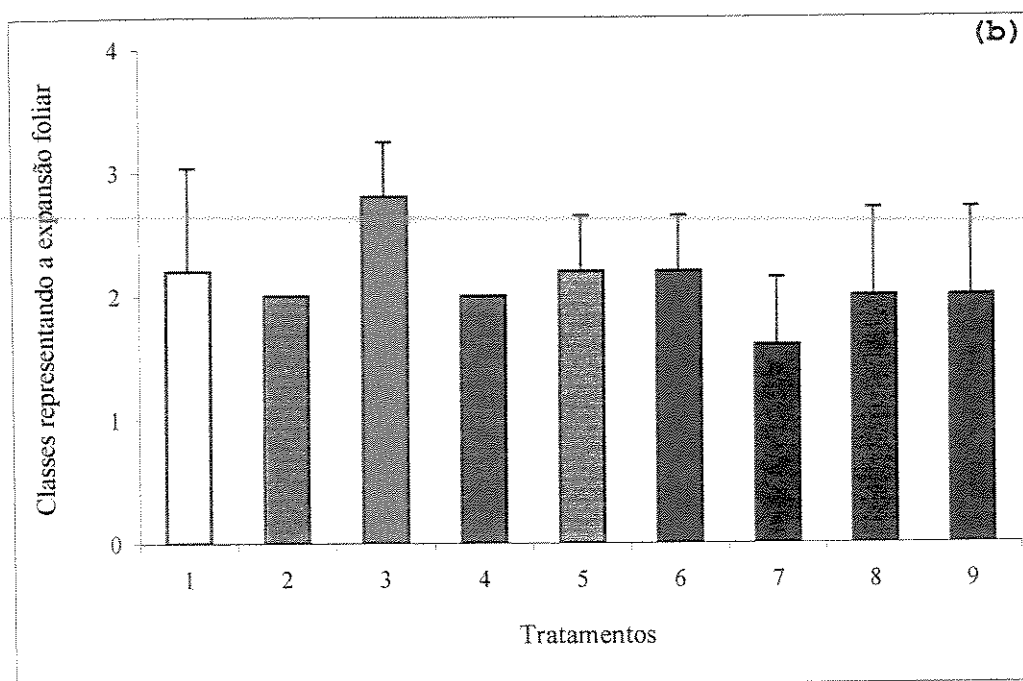
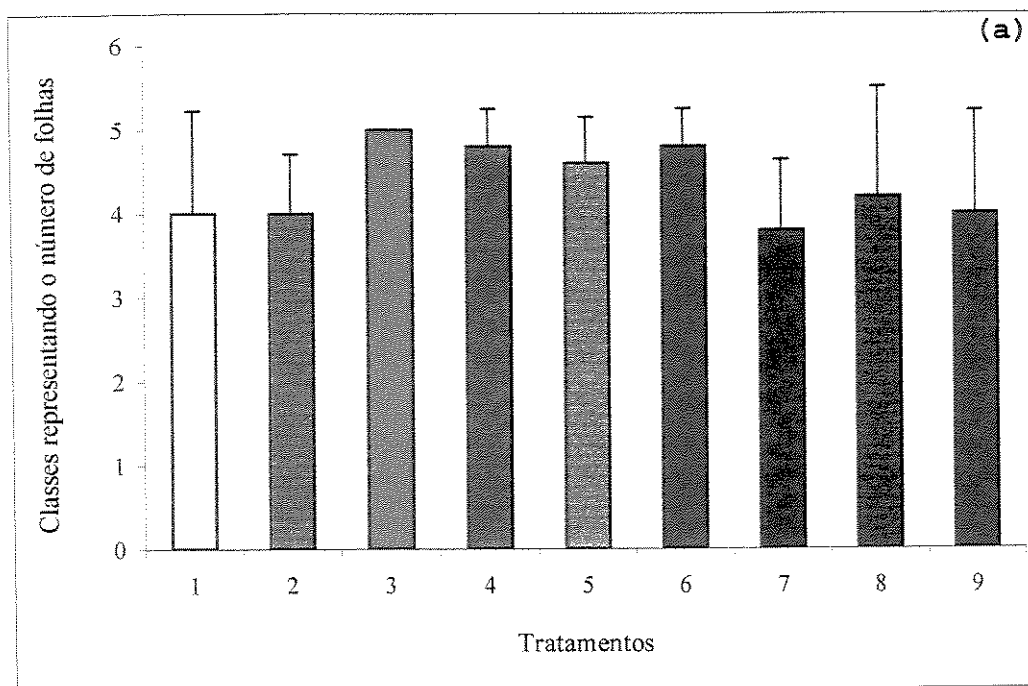


Figura 5. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito dos valores iniciais de pH do meio sobre os parâmetros número de folhas (a) e expansão foliar (b), após 90 dias de cultivo (médias e respectivos desvios padrões). Classes dos valores dos parâmetros: número de folhas - 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=acima de 15 folhas e expansão foliar - 1=pouca expansão (área de 9-38 mm²); 2=média expansão (38-66 mm²) e 3=grande expansão (66-94 mm²). Diferenças não foram significativas entre os tratamentos, com uma tendência para maiores valores dos parâmetros no tratamento 3.

Valores iniciais do pH do meio:					
4,2	4,4	4,6	4,8	5,0	5,2
			5,4	5,6	5,8



2-Efeito das diferentes concentrações de KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Os valores de pH do meio MS com diferentes concentrações de KH_2PO_4 e de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, durante os 90 dias do cultivo, não apresentaram variações significativas, mantendo-se entre 4,6 e 5,0. Os resultados do efeito das diferentes combinações de concentrações de KH_2PO_4 e de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sobre os parâmetros evidenciaram que os tratamentos 1 (meio MS com 100% da concentração de KH_2PO_4 e de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 16 (meio MS com a ausência destes nutrientes) foram estatisticamente semelhantes para todos os parâmetros, com o maior crescimento dos explantes nestes tratamentos.

Os parâmetros analisados apresentaram valores significativamente menores com diferenças ao nível de 0,1% (Duncan 5%) nos tratamentos 6, 7, 9, 12 e 13 para o comprimento do eixo principal (tabela 2), nos tratamentos 6, 7 e 9 para o número (tabela 3) e comprimento de raízes (tabela 4) e no tratamento 6 para o número de folhas (tabela 5). O parâmetro expansão foliar (tabela 6) não apresentou diferenças significativas e a porcentagem de clorose foi significativamente maior, ao nível de 5%, nos tratamentos 7 e 9 (tabela 7). Em tais tratamentos o meio era constituído de menores concentrações de KH_2PO_4 e/ou de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e/ou a ausência de um deles, havendo uma tendência para valores médios mais baixos nos tratamentos com KH_2PO_4 na concentração de 0,125

mmoles.l⁻¹ (dez vezes diluído em relação ao meio MS) para o comprimento da estaca, número e comprimento das raízes, número e expansão foliar, e valores mais altos para a porcentagem de clorose.

3-Efeito das diferentes concentrações de nutrientes, particularmente em relação ao NO₃⁻

Não ocorreu diferenças significativas nos parâmetros dos explantes cultivados nos meios MS, MS com KNO₃ diluído em 50%, MS (diluído em 25%), meio B5 e B5 50% diluído. No meio B5 50% poderia se dizer que houve uma tendência para valores mais altos em todos os parâmetros analisados, especialmente em relação à expansão foliar que apresentou valores significativamente maiores neste meio (figura 6 e 7).

Tabela 2. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do comprimento do eixo principal (cm) dos explantes de *S. allagophylla*, após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de KH_2PO_4 ($1,25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) e de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0-3,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$).

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) *	KH_2PO_4 ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) *				Média dos tratamentos
	1,25	0,125	0,0125	0,0	
3,1	$3,1 \pm 0,48 \text{ ab}$	$2,6 \pm 0,50 \text{ bc}$	$1,8 \pm 0,26 \text{ de}$	$1,8 \pm 0,23 \text{ de}$	$2,3 \pm 0,64$
0,31	$3,2 \pm 0,38 \text{ a}$	$1,5 \pm 0,33 \text{ e}$	$2,6 \pm 0,58 \text{ bc}$	$2,3 \pm 0,47 \text{ cd}$	$2,4 \pm 0,71$
0,031	$2,7 \pm 0,87 \text{ abc}$	$1,7 \pm 0,22 \text{ de}$	$2,6 \pm 0,70 \text{ bc}$	$2,9 \pm 0,56 \text{ abc}$	$2,5 \pm 0,53$
0,0	$3,1 \pm 0,85 \text{ b}$	$2,6 \pm 0,38 \text{ bc}$	$1,8 \pm 0,20 \text{ de}$	$3,2 \pm 0,35 \text{ ab}$	$2,7 \pm 0,64$
Média dos tratamentos	$3,0 \pm 0,22$	$2,1 \pm 0,58$	$2,2 \pm 0,46$	$2,5 \pm 0,62$	

* Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan).

Tabela 3. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) das classes que representam intervalos de valores do número de raízes dos explantes de *S. allagophylla*, após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de KH_2PO_4 (1,25 mmols. l^{-1}) e de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0-3,1 mmols. l^{-1}).

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mmols. l^{-1})	KH_2PO_4 (mmols. l^{-1}) *				Média dos tratamentos
	1,25	0,125	0,0125	0,0	
3,1	2,0 $\pm$ 1,00 abc	2,2 $\pm$ 0,45 ab	1,2 $\pm$ 0,45 c	1,4 $\pm$ 0,55 bc	1,7 $\pm$ 0,47
0,31	2,0 $\pm$ 0,71 abc	1,2 $\pm$ 0,45 c	2,4 $\pm$ 0,55 a	1,6 $\pm$ 0,55 abc	1,8 $\pm$ 0,52
0,031	2,0 $\pm$ 0,00 abc	1,2 $\pm$ 0,45 c	2,2 $\pm$ 0,45 ab	2,2 $\pm$ 0,84 ab	1,9 $\pm$ 0,47
0,0	1,8 $\pm$ 0,83 abc	1,8 $\pm$ 0,45 abc	2,0 $\pm$ 0,71 abc	2,2 $\pm$ 0,45 ab	1,9 $\pm$ 0,19
Média dos tratamentos	1,9 $\pm$ 0,10	1,6 $\pm$ 0,49	1,9 $\pm$ 0,52	1,8 $\pm$ 0,41	

* Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 5% (teste de Duncan).

Classes - 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=mais de 15 raízes.

Tabela 4. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) das classes que representam intervalos de valores do comprimento das raízes dos explantes de *S. allagophylla*, após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de KH_2PO_4 (1,25 mmol. l^{-1}) e de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0-3,1 mmol. l^{-1}).

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mmol. l^{-1})	KH_2PO_4 (mmol. l^{-1}) *				Média dos tratamentos
	1,25	0,125	0,0125	0,0	
3,1	2,2 $\pm$ 1,30 abc	2,4 $\pm$ 0,55 ab	1,2 $\pm$ 0,45 c	1,4 $\pm$ 0,55 bc	1,8 $\pm$ 0,59
0,31	2,4 $\pm$ 1,14 ab	1,2 $\pm$ 0,45 c	2,0 $\pm$ 0,00 abc	1,6 $\pm$ 0,55 bc	1,8 $\pm$ 0,52
0,031	2,2 $\pm$ 0,45 abc	1,2 $\pm$ 0,45 c	2,2 $\pm$ 0,45 abc	2,4 $\pm$ 0,80 ab	2,0 $\pm$ 0,54
0,0	2,0 $\pm$ 1,22 abc	2,0 $\pm$ 0,71 abc	2,2 $\pm$ 0,84 abc	2,8 $\pm$ 0,44 a	2,2 $\pm$ 0,38
Média dos tratamentos	2,2 $\pm$ 0,16	1,7 $\pm$ 0,60	1,9 $\pm$ 0,47	2,0 $\pm$ 0,66	

* Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan).

Classes - 1=0,0cm; 2=0,1 a 1,0cm; 3=1,0 a 2,0cm; 4=2,0 a 3,0cm; 5=3,0 a 4,0cm.

Tabela 5. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) das classes que representam intervalos de valores do número de folhas dos explantes de *S. allagophylla*, após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de KH_2PO_4 (1,25 mmol. l^{-1}) e de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0-3,1 mmol. l^{-1}).

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mmol. l^{-1})	KH_2PO_4 (mmol. l^{-1}) *				Média dos tratamentos
	1,25	0,125	0,0125	0,0	
3,1	4,8 $\pm$ 0,45 a	4,4 $\pm$ 0,55 abc	3,8 $\pm$ 0,45 cd	4,0 $\pm$ 0,71 bcd	4,2 $\pm$ 0,44
0,31	5,0 $\pm$ 0,00 a	2,8 $\pm$ 0,45 e	4,6 $\pm$ 0,55 ab	4,6 $\pm$ 0,55 ab	4,2 $\pm$ 0,98
0,031	4,4 $\pm$ 0,55 abc	3,6 $\pm$ 0,55 d	4,4 $\pm$ 0,55 abc	4,8 $\pm$ 0,45 a	4,3 $\pm$ 0,50
0,0	4,8 $\pm$ 0,45 a	4,6 $\pm$ 0,55 ab	4,4 $\pm$ 0,55 abc	5,0 $\pm$ 0,00 a	4,7 $\pm$ 0,25
Média dos tratamentos	4,7 $\pm$ 0,25	3,8 $\pm$ 0,82	4,3 $\pm$ 0,35	4,6 $\pm$ 0,43	

* Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan).

Classes - 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=mais de 15 folhas.

Tabela 6. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) das classes que representam intervalos de valores da expansão foliar dos explantes de *S. allagophylla*, após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de KH_2PO_4 (1,25 mmol. l^{-1}) e de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0-3,1 mmol. l^{-1}).

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mmol. l^{-1})	KH_2PO_4 (mmol. l^{-1}) *				Média dos tratamentos
	1,25	0,125	0,0125	0,0	
3,1	2,0 $\pm$ 1,00	1,8 $\pm$ 0,84	1,6 $\pm$ 0,55	1,2 $\pm$ 0,45	1,6 $\pm$ 0,34
0,31	2,4 $\pm$ 0,55	1,0 $\pm$ 0,0	1,8 $\pm$ 0,84	1,4 $\pm$ 0,55	1,6 $\pm$ 0,59
0,031	2,0 $\pm$ 0,71	1,4 $\pm$ 0,55	2,0 $\pm$ 0,71	1,8 $\pm$ 0,45	1,8 $\pm$ 0,28
0,0	1,8 $\pm$ 0,84	1,8 $\pm$ 0,45	1,4 $\pm$ 0,55	2,0 $\pm$ 0,71	1,7 $\pm$ 0,25
Média dos tratamentos	2,0 $\pm$ 0,25	1,5 $\pm$ 0,38	1,7 $\pm$ 0,26	1,6 $\pm$ 0,36	

Diferenças entre os tratamentos não foram significativas.

Classes - 1=pouca expansão (área de 9-38 mm^2); 2=média expansão (38-66 mm^2) e 3=grande expansão (66-94 mm^2).

Tabela 7. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) das classes que representam intervalos de valores da porcentagem de clorose nas folhas dos explantes de *S. allagophylla*, após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de KH_2PO_4 ($1,25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) e de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0-3,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$).

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)	KH_2PO_4 ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) *				Média dos tratamentos
	1,25	0,125	0,0125	0,0	
3,1	$1,0 \pm 0,00 \text{ b}$	$1,0 \pm 0,00 \text{ b}$	$1,7 \pm 0,89 \text{ a}$	$1,5 \pm 0,84 \text{ ab}$	$1,3 \pm 0,35$
0,31	$1,0 \pm 0,00 \text{ b}$	$1,5 \pm 0,89 \text{ ab}$	$1,2 \pm 0,52 \text{ ab}$	$1,2 \pm 0,52 \text{ ab}$	$1,2 \pm 0,22$
0,031	$1,0 \pm 0,00 \text{ b}$	$1,7 \pm 0,84 \text{ a}$	$1,1 \pm 0,89 \text{ b}$	$1,0 \pm 0,00 \text{ b}$	$1,2 \pm 0,34$
0,0	$1,0 \pm 0,00 \text{ b}$	$1,1 \pm 0,26 \text{ b}$	$1,3 \pm 0,72 \text{ ab}$	$1,1 \pm 0,45 \text{ b}$	$1,1 \pm 0,12$
Média dos tratamentos	$1,0 \pm 0,00$	$1,3 \pm 0,33$	$1,3 \pm 0,28$	$1,2 \pm 0,22$	

* Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 5% (teste de Duncan).

Classes - 1=0%; 2=5 a 10%; 3=10 a 20%; 4=20 a 50%; 5=50 a 70% e 6=70 a 100%.

Figura 6. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes concentrações de nutrientes, particularmente do NO_3^- , sobre os parâmetros comprimento do eixo principal (a) e número de raízes (b), após 90 dias de cultivo (médias e respectivos desvios padrões), com uma tendência para valores maiores destes parâmetros no tratamento 5. Classes dos valores do parâmetro número de raízes - 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=acima de 15 raízes.

Tratamentos:			
■ MS		■ B5	
■ MS com 1/2 NO ₃		■ B5 50%	
■ MS com 1/4 NO ₃			

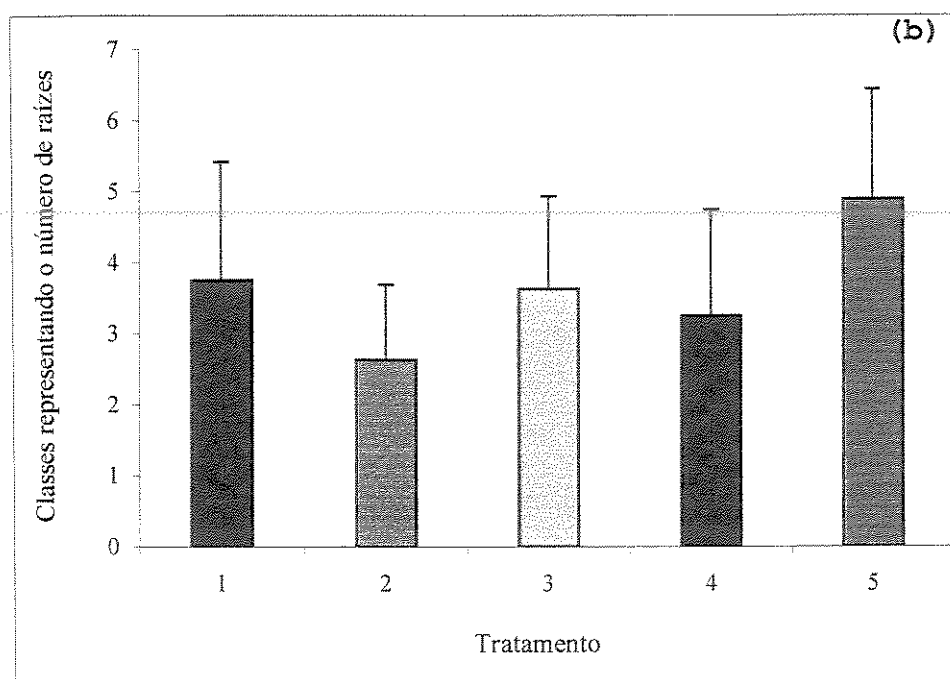
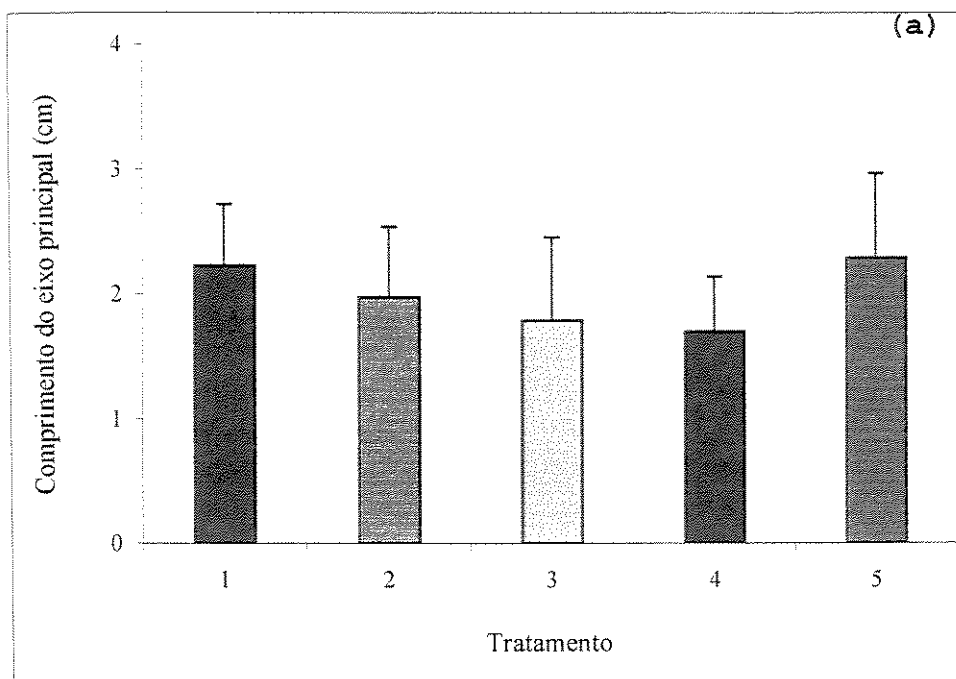
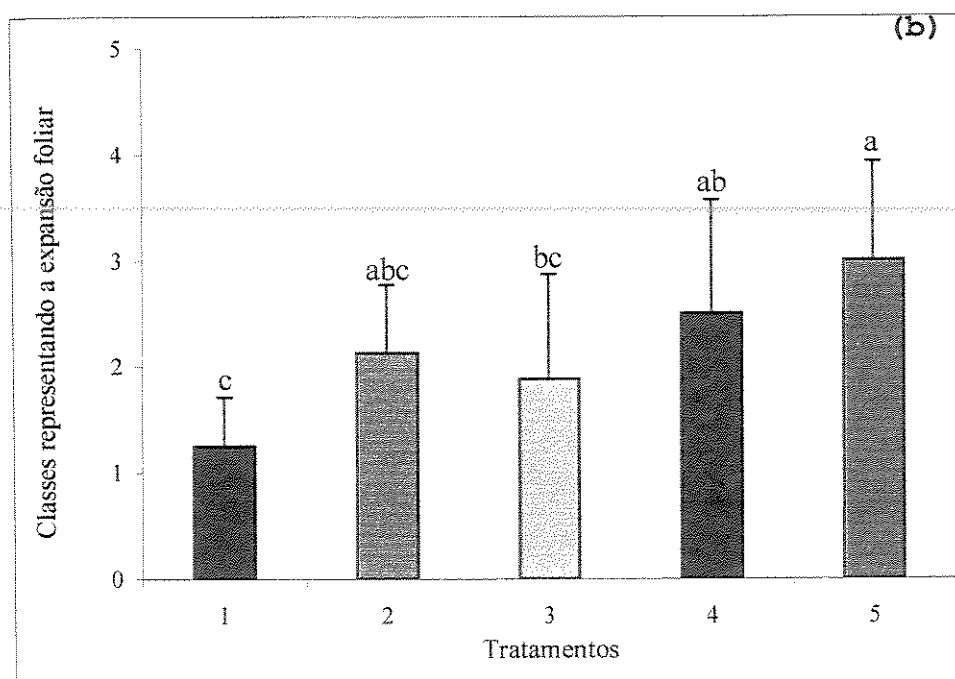
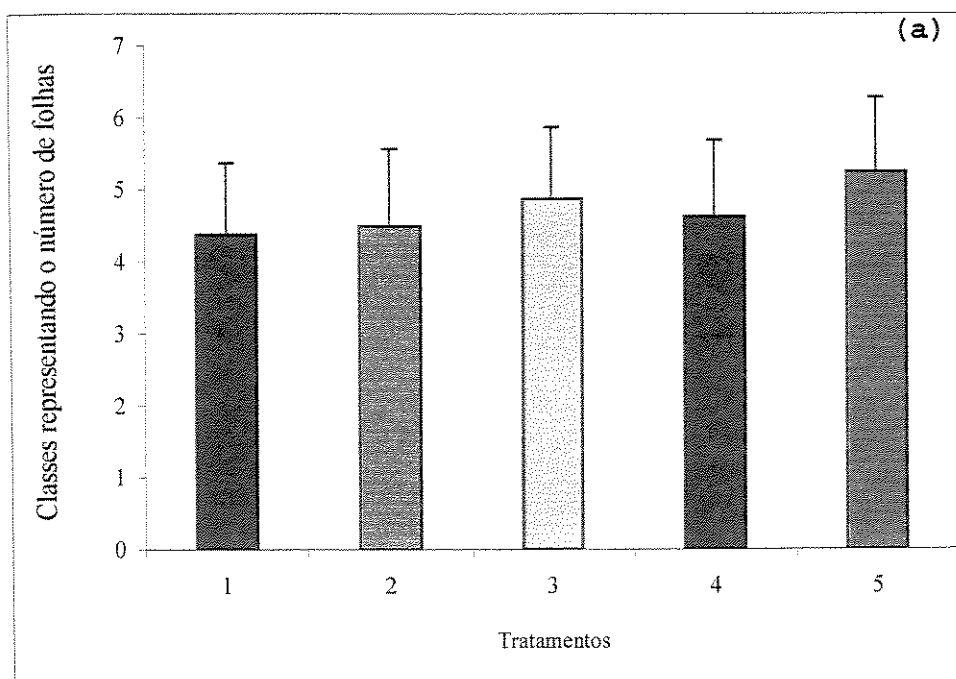


Figura 7. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes concentrações de nutrientes, particularmente do NO_3^- , sobre os parâmetros número de folhas (a) e expansão foliar (b), após 90 dias de cultivo (médias e respectivos desvios padrões). Classes dos valores dos parâmetros: número de folhas - 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=acima de 15 folhas e expansão foliar - 1=pouca expansão (área de 9-38 mm^2); 2=média expansão (38-66 mm^2) e 3=grande expansão (66-94 mm^2). Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 1% (teste de Duncan 5%) para a expansão foliar.

Tratamentos:			
MS		B5	
MS com 1/2 NO ₃		B5 50%	
MS com 1/4 NO ₃			



4-Análise do solo

O resultado da análise química da amostra do solo, da Reserva Biológica de Moji-Guaçu, indicou ser um solo extremamente ácido, com o valor do pH em 3,9, com baixos teores de Ca, Mg, Mn e Zn, teores muito baixos para P e K, médios para B e Cu e extremamente altos para o Fe ($30,0 \text{ mg/dm}^3$) e alto para o Al trocável ($7,08 \text{ mmol}_c/\text{dm}^3$). O nível de matéria orgânica apresentou-se dentro de valores considerados médios para solo do cerrado, a capacidade de troca catiônica (CTC) com um valor baixo e a saturação de bases com um valor extremamente baixo (tabela 8).

5-Análise das folhas

O resultado da análise química das folhas maduras, coletadas de plantas crescidas nesta reserva, foi de baixo teor de P, teores médios de N e Zn, altos de K, Ca, Mg, B, Cu, Mn e extremamente altos para o Fe ($1211,0 \text{ mg/kg}$) e para o Al ($2991,9 \text{ mg/kg}$) (tabela 9). Os resultados foram comparados com a tabela padrão, da composição nutricional considerada adequada, elaborada por Epstein (1975).

Tabela 8. 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 ₂	Soma bases	Ac. Potencial	Cap. Troca Cat.	Sat. bases
g/dm ³				mmol/dm ³		%
19		3,9	2,2	89	91,8	2

B	Cu	Fe	Mn	Zn	P	K	Ca	Mg	Al
mg/dm ³					mmol/dm ³				
0,24	0,4	30	1,1	0,2	2	0,2	1	1	7,08

Tabela 9. Resultado da análise química das folhas de plantas crescidas em campo cerrado, coletadas na Reserva Biológica de Moji-Guaçu.

N	K	P	Ca	Mg
g/kg				
15,1	19,7	0,9	10,8	6,0

B	Cu	Fe	Mn	Zn	Al
mg/kg					
50,3	8,4	1211,0	96,7	22,2	2991,9

DISCUSSÃO

A variação observada nos valores do pH do meio de cultivo, com a diminuição destes ao longo da subcultura, pode estar relacionada com a absorção diferencial de NH_4^+ e NO_3^- pelos explantes ou por produtos metabólicos excretados para o meio. A tendência de valores maiores para os parâmetros analisados nos tratamentos com menores valores do pH, após 90 dias de cultivo, demonstrou que a espécie estudada tem um valor de pH ótimo para o cultivo *in vitro* menor que o pH recomendado (pH 5,8) e que apresenta estratégias de adaptação para valores mais ácidos do pH. Sabe-se que baixos valores do pH afetam o crescimento das plantas pelo efeito direto do excesso de hidrogênio e indireto com a mudança na solubilidade de vários elementos minerais importantes (Islam et al., 1980).

A similaridade de resposta, estatisticamente significativa, obtida entre os tratamentos meio MS com 100% da concentração de KH_2PO_4 e de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e meio MS com ausência destes nutrientes, para todos os parâmetros analisados, com o maior crescimento destes em tais tratamentos, ou seja, do comprimento do eixo principal e das raízes, do número de raízes e folhas e da expansão foliar, indicou que a espécie *S. allagophylla* apresenta eficiência na utilização dos nutrientes exógenos presentes no meio MS. Também, parece possuir estratégias de economia e utilização de nutrientes,

características que vêm sendo observadas em estudos com diferentes espécies, onde sob controle genético espécies adaptadas aos solos ácidos, pobres em nutrientes, possuem eficiência em utilizar os nutrientes (Baligar et al., 1997). Já os tratamentos com combinações de menores concentrações de KH_2PO_4 e/ou de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e/ou ausência de um deles resultaram em um crescimento significativamente menor para todos os parâmetros analisados. Talvez tenha ocorrido um efeito de supressão ou de competição na utilização dos nutrientes pelos explantes, provavelmente mais com relação ao KH_2PO_4 .

Os resultados obtidos para o efeito particularmente do NO_3^- , para todos os parâmetros analisados, não mostraram diferenças significativas quanto à concentração utilizada, o que indica que a espécie tem eficiência para utilizar o nitrogênio e demais nutrientes em todos os tratamentos. O meio B5 diluído 50% provavelmente é o mais favorável para o seu cultivo in vitro, devido a uma tendência para maiores valores dos parâmetros citados e uma diferença significativamente maior para a expansão foliar nos explantes cultivados neste meio. Resultados semelhantes foram obtidos por Almeida (1994) para esta espécie, com maiores valores para o peso seco da raízes e parte aérea nos explantes cultivados em meio B5 diluído 50%.

A análise do solo mostrou que a espécie *S. allagophylla* cresce em solo extremamente ácido, pobre em nutrientes e bases trocáveis, baixa CTC e com teores de Fe e de Al trocável

considerados tóxicos, características encontradas em solo de cerrado, pela sua origem geológica e a ação do intemperismo e lixiviação, que causam a perda por dissolução de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} , PO_4 e N, resultando em um aumento da acidez do solo. Com esta acidez ocorre a remoção dos cátions trocáveis dos locais de troca catiônica e o aumento da solubilidade do íons Al (Malavolta & Kliemann, 1985). Os valores absolutos de Al trocável não foram extremamente altos ($7,08 \text{ mmol}_c/\text{dm}^3$, sendo considerados altos acima de $10,0 \text{ mmol}_c/\text{dm}^3$), entretanto como os valores de Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^{+} são extremamente baixos, os valores relativos do Al trocável são considerados altos e tóxicos. Já o valor obtido na amostra para a saturação de bases foi extremamente baixo, entretanto o valor para a CTC não foi extremamente baixo, indicando que provavelmente a matéria orgânica, com teor de $19\text{g}/\text{dm}^3$, considerado médio para solos de cerrado, seja a principal fração envolvida na formação de cargas negativas e troca de cátions neste solo. Resultados semelhantes foram observados em estudos realizados por Lopes (1984), com a análise de diferentes tipos de solos sob cerrados.

Pela análise química das folhas verificou-se que os teores dos nutrientes tenderam de médio para alto, com exceção do P que apresentou concentração de $0,9 \text{ g}/\text{kg}$ (adequada é $2 \text{ g}/\text{kg}$), evidenciando estratégias para alta eficiência na absorção, transporte e utilização da baixa quantidade dos nutrientes

disponíveis. Já os teores extremamente altos do Al e do Fe encontrados nas folhas, evidenciam que a espécie tolera bem tais elementos, podendo ser considerada uma acumuladora de Al, pois apresenta em suas folhas uma concentração deste de 2991,9 mg/kg e cresce em solo com a concentração do Al trocável de 7,08 mmol_c/dm³. Esta concentração de Al trocável no solo pode ser considerada alta e determinante do pH ácido do solo, como também a planta é considerada uma acumuladora de Al por apresentar mais de 1000 mg/kg, conforme dados fornecidos por Haridasan (1982). A espécie *S. allagophylla* provavelmente apresenta como estratégia a formação de complexos do Al com ácidos orgânicos e/ou proteínas e/ou outros agentes complexantes (Kochian, 1995). Também, os altos teores dos nutrientes essenciais presentes em suas folhas demonstram que a espécie provavelmente apresenta, como forma de tolerância ao Al, a habilidade em manter o fluxo de íons e o potencial de membrana nas células das raízes na presença do Al (Miyasaka et al., 1989).

LITERATURA CITADA

- Abreu, C.A., Abreu, M.F., Raij, B. van, Bataglia, O.C. & Andrade, J.C., 1994. Extraction of boron from soil by microwane heating for ICP-AES determination. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 25 (19 & 20): 3321-3333.
- 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., 1998. *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae): cultivation *in vitro* of a native plant of Brazilian cerrado. Revta brasil. Bot. (no prelo).
- Baligar, V.C., Pitta, G.V.E., Gama, E.E.G., Schaffert, R.E., Bahia Filho, A.F.C. & CLARK, R.B., 1997. Soil acidity effects on nutrient use efficiency in exotic maize genotypes. Plant Soil 192: 9-13.
- Bataglia, O.C., Furlani, A.M.C., Teixeira, J.P.F., Furlani, P.R. & Gallo, J.R., 1983. Métodos de análise química de plantas (Boletim Técnico), Instituto Agronômico, Campinas, 78p.
- Epstein, L., 1975. Os componentes inorgânicos das plantas. In: nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas, 2nd Edition, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, p.50-52.

Ferri, M.G., 1969. Plantas do Brasil - espécies do cerrado. E. Blucher & EDUSP, São Paulo, p.178-179.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. & Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exptl. Cell Res. 50: 151-158.

Goodland, R., 1979. Relações planta - solo. In: Ecologia do cerrado (R. Goodland & M.G. Ferri, eds.) EDUSP, São Paulo, p.146-157.

Haridasan, M., 1982. Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil. Plant soil 65: 265-273.

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.

Islam, A.K.M.S., Edwards, D.G. & Asher, C.J., 1980. pH optima for crop growth. Plant Soil 54:339-357.

Ker, J.C., Pereira, N.R., Carvalho Junior, W. & Carvalho Filho, A., 1992. In: Simpósio sobre manejo e conservação do solo no cerrado, Campinas, Brasil, anais, p.1-28.

Kochian, L.V., 1995. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46: 237-260.

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.
- Lindsay, W.L. & Norvell, W.A., 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Am. J.* 42(3): 421-428.
- Lopes, A.S., 1984., Solos sob cerrado. Características, propriedades e manejo. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, Piracicaba.
- Malavolta, E. & Kliemann, H.J., 1985. Desordens Nutricionais no Cerrado. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, Piracicaba, p.116-198.
- Malavolta, E., Vitti, G.C. & Oliveira, S.A., 1997. Princípios, métodos e técnicas de avaliação. In: Avaliação do estado nutricional das plantas, 2nd Edition, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, Piracicaba.
- Meharg, A. A., 1994. Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant Cell Envir.* 17: 989-993.
- Miyasaka, S.C., Kochian, L.V., Shaff, J.E. & Foy, C.D., 1982. Mechanisms of aluminum tolerance in wheat. *Plant Physiol.* 91: 1188-1196.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Raij, B. van, Quaggio, J.A., Cantarella, H., Ferreira, M.E.,
Lopes, A.S. & Bataglia, O.C., 1987. Análise química do solo
para fins de fertilidade. Fundação Cargill, Campinas, 170p.

Ratter, J.A. & Ribeiro, J.F., 1996. Biodiversity of the flora
of the cerrado. In: VIII Simpósio Sobre o Cerrado, Brasília,
Brasil, anais, p.2-5.

Yexkül, H.R. & Mutert, E., 1995. Global extent, development and
economic impact of acid soils. Plant Soil 171: 1-15.

Zaidan, L.R.P. & Ribeiro, R.C.F. 1995. Aproveitamento econômico
de espécies nativas. In: Workshop Bases para a Conservação e
Uso Sustentável das Áreas de Cerrado do Estado de São Paulo,
Pirassununga, Brasil, Relatório, p.47.

CAPÍTULO III

MORFOGÊNESE E CRECIMENTO *IN VITRO* DE *Sinningia*
allagophylla (GESNERIACEAE): EFEITO DE NUTRIENTES,
SACAROSE, FITORREGULADORES E FOTOPERÍODO

ABREVIATURAS

.....AIA..	-	ácido 3-indolilacético
ANA	-	ácido naftalenoacético
BA	-	6-benzilaminopurina
B5	-	meio Gamborg <i>et al.</i> (1968)
CCC	-	cloreto de 2-cloroetila trimetilamônia
GA ₃	-	ácido giberélico
KIN	-	kinetin (cinetina)
MS	-	meio Murashige & Skoog (1962)

RESUMO

Explantes obtidos a partir de segmentos nodais de plântulas da espécie do cerrado *Sinningia allagophylla* crescidas *in vitro*, foram cultivados em meios com diferenças nas concentrações de nutrientes, de sacarose e de fitorreguladores. Seis experimentos foram realizados em esquema fatorial: nos quatro primeiros os explantes foram cultivados em meio B5, diluído 50% e suplementado com sacarose 3% (p/v), sendo testados os efeitos das concentrações dos fitorreguladores: 1ºexperimento - combinações de BA (0,01 e 0,1 µg/ml) e de cinetina (0,01 e 0,1 µg/ml) com AIA (0,1 µg/ml); 2ºexperimento - BA (0,01 e 0,1 µg/ml) com GA₃ (0,1 e 1,0 µg/ml); 3ºexperimento - BA (0,01 e 0,1 µg/ml) com CCC (0,1 e 1,0 µg/ml) e 4ºexperimento - combinações de BA (0,005 e 0,01 µg/ml) e de cinetina (0,01 e 0,1 µg/ml) com ANA (0,01 e 0,1 µg/ml). No quinto experimento foi utilizado o meio MS no estado sólido e foram observados os efeitos das razões de fonte de nitrogênio, KNO₃:NH₄NO₃, e das concentrações de sacarose (3%, 4%, 8% e 10% p/v). No sexto experimento os explantes foram cultivados em meio B5 no estado líquido e observou-se o efeito da diluição da composição mineral do meio (B5 100%, diluído em 50%, 75% e ausência total do meio) e das concentrações da sacarose (3%, 4% e 6% p/v). Os meios acrescidos dos fitorreguladores induziram a

formação de calo na base do explante e de clorose das folhas. Os fitorreguladores BA e ANA, nas mais baixas concentrações testadas, induziram, sozinhos ou combinados, valores estatisticamente maiores para o comprimento do eixo principal; número e comprimento de raízes. GA₃ sozinho teve efeito apenas na indução do crescimento do eixo principal e combinado com BA reverteu o efeito indutor deste último na formação tanto de raízes como no crescimento do eixo. AIA e CCC não apresentaram efeitos significativos sobre os parâmetros analisados e cinetina só foi efetiva em fotoperíodo de 18h para o parâmetro comprimento do eixo principal. A maior concentração de NH₄⁺ das razões testadas do meio MS induziu o desenvolvimento da parte aérea, já a maior concentração de NO₃⁻ induziu o desenvolvimento radicular. Quanto à sacarose, as maiores concentrações (8% e 10% p/v) foram, ao mesmo tempo, tóxicas para a parte aérea e indutoras de raízes. As interações da concentração de composição mineral com concentrações da fonte de energia, realizadas no meio B5 com ausência total de fitorreguladores, mostraram que o crescimento dos explantes (mais especificamente o comprimento do eixo principal e o desenvolvimento radicular) apresentou diferenças entre os tratamentos mais em relação à sacarose que à composição mineral, isto porque os resultados foram igualmente satisfatórios no meio com composição mineral total e suplementado com sacarose 3% (p/v) e nos meios diluídos e com concentrações maiores de sacarose. O cultivo no

fotoperíodo de oito horas de luz resultou em promoção do crescimento da parte aérea e das raízes; já no cultivo em dezoito horas de luz os efeitos de toxicidade foram maiores nos explantes, com uma porcentagem significativamente maior de clorose das folhas neste fotoperíodo.

Palavras chaves: cerrado, cultivo *in vitro*, nutrientes, reguladores de crescimento.

SUMMARY

Explants obtained from nodal segments of seedling of the cerrado plant *Sinningia allagophylla* grown *in vitro* were cultivated in media with different concentrations of nutrients, sucrose and plant growth regulators. Six experiments were carried out, using a factorial design: in the first four, explants were cultivated in B5 medium, diluted 50% and supplemented with 3% (w/v) sucrose to test effects of plant growth regulators. Experiment 1 used combinations of BA (0.01 and 0.1 $\mu\text{g/ml}$) and KIN (0.01 and 0.1 $\mu\text{g/ml}$) with AIA (0.1 $\mu\text{g/ml}$); experiment 2- BA (0.01 and 0.1 $\mu\text{g/ml}$) with GA₃ (0.1 and 1.0 $\mu\text{g/ml}$); experiment 3- BA (0.01 and 0.1 $\mu\text{g/ml}$) with CCC (0.1 and 1.0 $\mu\text{g/ml}$) and experiment 4- BA combinations (0.005 and 0.01 $\mu\text{g/ml}$) and of KIN (0.01 and 0.1 $\mu\text{g/ml}$) with NAA (0.01 and 0.1 $\mu\text{g/ml}$). The fifth experiment used solid MS medium to observe the effects of different proportions of nitrogen sources, KNO₃:NH₄NO₃, at varying sucrose concentrations (3%, 4%, 8% and 10% w/v). In the sixth experiment, explants were cultivated in liquid B5 medium to study the effect of different dilutions of the mineral component of the medium (B5 - 100%, 50%, 25% and total absence of medium) and sucrose concentration (3%, 4% and 6% w/v). Media with added plant growth regulators induced callus formation at the base of the shoot and leaf

chlorosis. The plant growth regulators BA and NAA at the lowest concentrations tested together or separately induced statistically significant increases in shoot length and in number and length of roots. GA₃ by itself only affected cutting growth and when combined with BA, it reversed the effect of the latter on root formation and cutting growth. IAA and CCC did not present significant effects on the parameters measured and KIN was effective only in 18h photoperiods for cutting growth. A higher proportion of NH₄⁺ in the MS medium promoted growth of aerial parts while greater proportions of NO₃⁻ promoted root development. Higher concentrations of sucrose (8% and 10% w/v) simultaneously were toxic to shoot development and promoted root growth. Interactions between mineral concentration with sucrose concentration showed that growth (more specifically shoot length and root development) responded more to sucrose concentration than mineral concentration since equally satisfactory results were obtained in full medium supplemented with 3% sucrose and in diluted media with higher concentrations of sucrose. Cultivation in an eight hour photoperiod resulted in promotion of root and shoot growth while in the eighteen hour photoperiod, toxic effects were greater in explants, with a significantly higher percentage of leaf chlorosis in this photoperiod.

Key words: cerrado, *in vitro* culture, nutrient, growth regulators.

INTRODUÇÃO

A cultura *in vitro* tem sido utilizada para a propagação de produtos agrícolas, principalmente na área de horticultura e floricultura e também para a conservação de germoplasma e para a propagação e conservação de espécies de plantas selvagens e/ou ameaçadas de extinção. Apresenta maiores vantagens sobre as técnicas de propagação convencional por produzir um grande número de brotos em condições controladas, livres de patógenos, a partir de pequena quantidade de material inicial (Fay, 1993).

Para o sucesso do cultivo *in vitro* de plantas é necessária a inclusão no meio de cultivo de hormônios e de fitorreguladores (Gaspar *et al.*, 1996). A adição de um certo fitorregulador pode modular o balanço hormonal endógeno, bem como a resposta celular aos hormônios (Charrière & Hahne, 1998). A resposta de uma determinada planta, ou tecido, a estas interações não é previsível e depende de fatores genéticos e variáveis fisiológicas da planta, da interação receptor-fitorregulador e do desenvolvimento pela planta, ou tecido, da tolerância e sensibilidade pelo fitorregulador (Krikorian, 1995).

As auxinas e as citocininas são as classes de fitorreguladores mais utilizadas na cultura de tecidos (Caldas *et al.*, 1990). O trabalho clássico de Skoog & Miller (1957) estabelece para o cultivo *in vitro* do tabaco um balanço entre

níveis de citocininas e auxinas presentes no meio, com uma taxa relativamente alta de AIA em relação à cinetina favorecendo a formação de raízes, o reverso favorecendo a formação de brotos e concentrações intermediárias a proliferação de calos.

Segundo Grattapaglia & Machado (1990) a adição de citocininas é favorável e mesmo necessária, sendo a citocinina sintética BA geralmente a que apresenta os melhores resultados. Das auxinas, a auxina natural AIA é a menos estável em condições de meio de cultura devido à fotooxidação e a ação da AIA-oxidase nos tecidos dos explantes, sendo a auxina sintética ANA a mais favorável e bastante utilizada. Já a giberelina (na forma de GA₃) é pouco utilizada como hormônio exógeno, suplementado no meio de cultivo, devido ao suprimento endógeno ser suficiente.

Krikorian (1995) comenta que não apenas os hormônios e os fitorreguladores devem ser considerados nos resultados do cultivo *in vitro*, mas também outros fatores relacionados com as atividades intra e extracelulares e, assim, com o crescimento das plantas, como os elementos nutricionais e suas concentrações no meio; a fonte de energia; o pH e a temperatura.

A concentração de sacarose, ou de outra fonte de energia, apresenta efeito marcante sobre a multiplicação e o crescimento *in vitro* de plantas. A inclusão da fonte de energia no meio sempre foi considerada necessária para o cultivo *in vitro*, pois

a atividade fotossintética dos tecidos *in vitro* é reduzida. Hdider & Desjardins (1994) observaram que plântulas realizam fotossíntese quando cultivadas *in vitro* em concentrações de sacarose de 0-1% (p/v). Mas os mesmos autores observaram que a sacarose é importante em estádios iniciais de crescimento, por elevar a atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), permitindo o estabelecimento *in vitro* das plântulas. Além disso, a adição de diferentes concentrações de sacarose no meio e combinações destas com substâncias reguladoras de crescimento, podem induzir diferentes respostas no desenvolvimento do explante utilizado (Jeannin et al., 1995) como, por exemplo, a dependência de GA₃, para a indução do crescimento em expansão, de um aumento na pressão de turgor determinada pela hidrólise de sacarose (Fry & Street, 1980). Outro exemplo do efeito da adição de sacarose é a obtenção de microtubérculos em explantes de batata, cultivados em meio MS sem adição de reguladores de crescimento, mas induzidos por concentrações mais altas de sacarose (Garner & Blake, 1989).

As duas formas de nitrogênio inorgânico utilizadas pelas plantas no solo - nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) - são geralmente incluídas em meio de cultivo *in vitro*. O efeito destes íons sobre o crescimento e desenvolvimento de culturas é bem evidenciado indicando ser a razão entre suas concentrações o fator determinante do crescimento, com a concentração do amônio devendo ser, no máximo, um terço da do nitrogênio total

(Caldas et al., 1990). Embora o nitrato seja a principal fonte de nitrogênio para a maior parte das espécies, algumas utilizam o amônio, como exemplificado por aquelas crescendo em solos ácidos do cerrado, onde o amônio é predominante devido à inativação das bactérias nitrificadoras (Kozovits et al., 1996).

A agricultura nos cerrados apresenta problemas devido ao déficit da saturação do ar na estação seca; fogo anual; solos com valores do pH marcadamente baixos, deficientes de nutrientes e com a presença do íon alumínio tóxico, além do lençol de água subterrâneo ser geralmente profundo (Ferri, 1971). Entretanto, o cerrado como ecossistema está atualmente bastante ameaçado com os grandes empreendimentos que vêm sendo instalado nesta região, tornando 40% da extensão de aproximadamente 2 milhões de km² que a região ocupa, destinadas às atividades agrícolas e de pastagens (Dias et al., 1996). Estudos sobre o desenvolvimento de espécies do cerrado são, desta forma, importantes por fornecerem subsídios para a implantação de programas de recuperação de áreas do cerrado (Sassaki et al., 1996).

S. allagophylla é uma espécie herbácea perene que cresce espontaneamente na região do cerrado. Apresenta características de espécies adaptadas ao cerrado, ou seja, estratégias adaptativas que superam o estresse térmico, hídrico, nutricional e os efeitos do fogo (Mantovani & Martins, 1988). O

sucesso desta espécie, como o de algumas outras herbáceas do cerrado, é o desenvolvimento de um órgão subterrâneo espessado, no qual as gemas ficam protegidas no solo durante as condições desfavoráveis do inverno seco e tépido e do fogo que ocorre com freqüência em áreas do cerrado (Goodland, 1979).

Estudos fenológicos realizados por Almeida (1994) indicaram que *S. allagophylla* apresenta um período de dormência de 5-6 meses, tanto no campo como em casa de vegetação, com perda total da parte aérea. Figueiredo-Ribeiro et al. (1986), visando detectar plantas do cerrado de potencial para a exploração econômica dos compostos de reserva em órgãos subterrâneos, ao fazerem um levantamento com dezessete espécies do cerrado, encontraram no órgão subterrâneo de *S. allagophylla* conteúdos de açúcares maiores que aqueles relatados em plantas que são reconhecidas como fonte destes compostos. Segundo os autores este ponto torna esta espécie, junto com *Ruellia geminifolia* e *Gomphrena officinalis*, interessantes para os estudos ecofisiológicos e bioquímicos.

Os fatores envolvidos no processo de tuberização de espécies do cerrado não são conhecidos, sendo os estudos de tuberização praticamente voltados apenas para *Solanum tuberosum*. Tais estudos evidenciaram que o estímulo para a indução da tuberização é produzido pelas folhas (Koda & Okazawa, 1988) e que são necessárias as condições: fotoperíodo

crítico da planta e a temperatura, com baixa temperatura geralmente inibindo a tuberização (Ewing & Wareing, 1978).

Reguladores de crescimento são geralmente utilizados para a obtenção *in vitro* de tubérculos. A indução e o desenvolvimento de microtubérculos são controlados pela interação de hormônios, com AIA e combinação de AIA com GA₃ não tendo um efeito significativo na microtuberização de *S. tuberosum*, e GA₃ sozinho sendo um importante fator controlando a iniciação do tubérculo (Escalante & Langille, 1995). Meio MS acrescido de BA e AIA induziu a microtuberização de *S. tuberosum* (Mader, 1995), bem como meio nutritivo com BA sozinho e suplementado com sacarose 4% (p/v) (Banfalvi et al., 1997). Outras substâncias como o ácido jasmônico (Koda et al., 1994) e poliaminas (Mader, 1995), tem induzido a microtuberização desta espécie, como também meio MS livre de hormônios, mas com alta concentração de sacarose (8% p/v) (Garner & Blake, 1989).

OBJETIVOS

.....Com o objetivo de se obter maiores informações das estratégias envolvidas no processo de adaptação de *S. allagophylla* às condições de cerrado, bem como para a obtenção de um meio otimizado, foram estudados o crescimento e a morfogênese *in vitro* desta espécie em relação aos efeitos de: fitorreguladores; fonte de nitrogênio; composição nutricional do meio de cultivo; concentração da fonte de energia e do fotoperíodo.

MATERIAL E MÉTODOS

1-Material vegetal

Os explantes consistiram de estacas com 0,8cm de comprimento e um par de folhas, sem a gema apical, obtidas de explantes da espécie com dois meses de cultivo *in vitro* em meio básico MS no estado sólido e suplementado com sacarose 3% (p/v). Tais explantes, por sua vez, foram obtidos de segmentos nodais de plântulas resultantes da germinação *in vitro*, sob condições assépticas, de sementes colhidas em área de campo cerrado, setor destinado a pesquisa não perturbatória, da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (SP- 22°15-16'S e 47°8-12'W, 585-635m de altitude) no Estado de São Paulo.

2-Condições de cultura

A influência dos fitorreguladores, da razão de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ e das concentrações de nutrientes e sacarose, bem como suas interações sobre a morfogênese e o crescimento e *in vitro* da espécie *S. allagophylla* foram determinados em seis experimentos fatoriais. Os experimentos foram realizados em temperatura constante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodos de 8 e de 18 horas de luz diária, sendo o material *in vitro* mantido em câmara de

crescimento Forma Scientific com intensidade luminosa de $35,49\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes. O valor do pH do meio de cultivo, em todos os tratamentos, foi de 4,8 (um valor de pH mais ácido e que permite a geleificação do meio).

Para todos os tratamentos utilizaram-se tubos de ensaio de fundo chato com 8 cm de altura e 2 cm de diâmetro contendo 6 ml do meio de cultivo, em cinco repetições, com um explante por repetição.

3-Métodos de avaliação

Neste trabalho foram analisados os seguintes parâmetros:

- comprimento do eixo principal em cm;
- número e comprimento das raízes;
- número de folhas e expansão foliar;
- número de brotos;
- porcentagem de clorose nas folhas;
- presença ou não da formação de calo.

Os efeitos dos diferentes tratamentos sobre os parâmetros mencionados foram obtidos após 90 dias do cultivo *in vitro* dos explantes. Nos resultados calculou-se a média, desvio padrão e realizou-se a análise de variância (ANOVA), entre os tratamentos e dentro dos tratamentos, e o teste de Duncan 5% para a diferenciação entre os dados obtidos (teste VARPC,

elaborado pelo Prof. Dr. Ladaslav Sodek, do Depto de Fisiologia Vegetal, IB/Unicamp).

O critério utilizado para a obtenção dos dados foi o uso de classes indicando um intervalo de valores, exceto para o comprimento do eixo principal:

-Classes dos valores dos parâmetros número de raízes, número de folhas e de brotos- 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=mais de 15.

-Classes dos valores comprimento das raízes- 1=0,0cm; 2=0,1 a 1,0cm; 3=1,0 a 2,0cm; 4=2,0 a 3,0cm; 5=3,0 a 4,0cm.

-Classes dos valores da expansão foliar- 1=pouca expansão (área de 9-38mm²); 2=média expansão (38-66mm²) e 3=grande expansão (66-94mm²).

-Classes dos valores porcentagem de clorose- 1=0%; 2=5 a 10%; 3=10 a 20%; 4=20 a 50%; 5=50 a 70% e 6=70 a 100%.

-Classes dos valores presença de calo- 1=não presente; 2=presente.

4-Tratamentos com diferentes combinações de fitorreguladores

Foram realizados quatro experimentos em esquema fatorial, em meio B5 diluído 50%, no estado sólido e suplementado com sacarose 3% (p/v), e com diferentes interações de reguladores de crescimento:

- (a) combinações de BA e de cinetina com AIA (tabela 1);
- (b) combinações de BA com GA₃ (tabela 2);
- (c) combinações de BA e CCC (tabela 3);
- (d) combinações de BA e de cinetina com ANA (tabela 4).

Tabela 1. Combinações de BA e de cinetina com AIA.

AIA ($\mu\text{g/ml}$)	BA ($\mu\text{g/ml}$)			Cinetina ($\mu\text{g/ml}$)	
	0,0	0,01	0,1	0,01	0,1
0,0	1	3	5	7	9
0,01	2	4	6	8	10

Tabela 2. Combinações de BA e GA₃.

GA ₃ ($\mu\text{g/ml}$)	BA ($\mu\text{g/ml}$)		
	0,0	0,01	0,1
0,0	1	4	7
0,1	2	5	8
1,0	3	6	9

O hormônio GA₃ foi acrescentado ao meio de cultivo após ser esterilizado a frio com o filtro de acetato de celulose (Millipore).

Tabela 3. Combinações de BA e CCC.

CCC (µg/ml)	BA (µg/ml)		
	0,0	0,01	0,1
0,0	1	4	7
0,1	2	5	8
1,0	3	6	9

Tabela 4. Combinações de BA e de cinetina com ANA.

ANA (µg/ml)	BA (µg/ml)			Cinetina (µg/ml)	
	0,0	0,005	0,01	0,01	0,1
0,0	1	4	7	10	13
0,01	2	5	8	11	14
0,1	3	6	9	12	15

5-Tratamentos com diferentes razões de nitrato:amônio e interações destas razões com concentrações variadas de sacarose

Foram realizados 20 tratamentos em meio básico MS, no estado sólido, com diferentes razões de KNO_3 e de NH_4NO_3 , combinadas com concentrações variadas de sacarose (tabela 5).

6-Tratamentos com diferentes diluições do meio B5 e interações destas diluições com concentrações variadas de sacarose

Foram realizados 12 tratamentos em meio B5, no estado líquido, com 100% dos nutrientes, e com diluições mantendo 50% dos nutrientes, 25% e ausência total destes. Os diferentes meios, quanto a sua diluição, foram combinados com concentrações variadas de sacarose (tabela 6). Os explantes foram cultivados sobre suporte de papel de filtro Whatman nº1.

Tabela 5. Interações de $\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{NO}_3$ com diferentes concentrações de sacarose.

Sacarose (p/v)	Tratamentos				
	A	B	C	D	E
3%	1	5	9	13	17
4%	2	6	10	14	18
8%	3	7	11	15	19
10%	4	8	12	16	20

A= NH_4NO_3 20,62 mmols. l^{-1} ; KNO_3 18,81 mmols. l^{-1} (controle, com total de 27,53 mmols. l^{-1} de NO_3^- e 4,64 mmols. l^{-1} de NH_4^+ - 100% em relação ao meio MS- 85% NO_3^- ; 15% NH_4^+).

B= NH_4NO_3 20,62 mmols. l^{-1} ; KNO_3 9,40 mmols. l^{-1} (com total de 21,75 mmols. l^{-1} de NO_3^- e 4,64 mmols. l^{-1} de NH_4^+ - 82% NO_3^- ; 18% NH_4^+).

C= NH_4NO_3 20,62 mmols. l^{-1} ; KNO_3 4,70 mmols. l^{-1} (com total de 18,86 mmols. l^{-1} de NO_3^- e 4,64 mmols. l^{-1} de NH_4^+ - 80% NO_3^- ; 20% NH_4^+).

D= KNO_3 18,81 mmols. l^{-1} ; NH_4NO_3 10,31 mmols. l^{-1} (com total de 19,54 mmols. l^{-1} de NO_3^- e 2,32 mmols. l^{-1} de NH_4^+ - 90% NO_3^- ; 10% NH_4^+).

E= KNO_3 18,81 mmols. l^{-1} ; NH_4NO_3 5,16 mmols. l^{-1} (com total de 15,54 mmols. l^{-1} de NO_3^- e 1,16 mmols. l^{-1} de NH_4^+ - 93% NO_3^- ; 7% NH_4^+).

Tabela 6. Interações entre diferentes diluições do meio B5 com concentrações variadas de sacarose.

Sacarose (p/v)	Tratamentos			
	A	B	C	D
3%	1	4	7	10
4%	2	5	8	11
6%	3	6	9	12

A= meio B5 com a composição mineral total.

B= meio B5 com a composição mineral diluída 50%.

C= meio B5 com a composição mineral diluída 75%.

D= ausência total do meio B5.

RESULTADOS

1-Efeito das combinações de BA e de cinetina com AIA

O fitorregulador BA apresentou um efeito significativamente maior, em relação ao controle e demais tratamentos, sobre o crescimento dos explantes (figura 1). BA (0,01 e 0,1 $\mu\text{g/ml}$), sozinho e combinado com AIA (0,01 $\mu\text{g/ml}$), estimulou a formação de calo na base do explante (figura 8), de brotos (figura 6) e o maior número de raízes e comprimento destas (figura 3), nos explantes cultivados em ambos fotoperíodos, com diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan 5%) em relação ao controle e demais tratamentos, os quais apresentaram respostas semelhantes ao controle.

Para o comprimento do eixo principal e expansão foliar houve diferenças no efeito dos fitorreguladores em relação aos fotoperíodos. BA sozinho (0,01 e 0,1 $\mu\text{g/ml}$) e combinado com AIA (0,01 $\mu\text{g/ml}$) determinou valores significativamente maiores, ao nível de 0,1%, para o comprimento do eixo principal (figura 2) em fotoperíodo de 8h. O fitorregulador BA sozinho (0,1 $\mu\text{g/ml}$) e combinado com AIA (0,01 $\mu\text{g/ml}$) determinou valores significativamente maiores, ao nível de 0,1%, para a expansão foliar (figura 5) neste fotoperíodo. Já no fotoperíodo de 18h

cinetina sozinha (0,01 e 0,1 $\mu\text{g/ml}$) foi quem induziu valores significativamente maiores para estes parâmetros.

O número de folhas não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos em fotoperíodo de 8h, entretanto em 18h houve uma diminuição significativa, ao nível de 5%, das folhas dos explantes cultivados em meios com BA sozinhos (0,01 $\mu\text{g/ml}$) e combinado com AIA (0,01 $\mu\text{g/ml}$) (figura 4).

A porcentagem de clorose nas folhas dos explantes foi significativamente maior em cinetina (0,1 $\mu\text{g/ml}$) combinada com AIA (0,01 $\mu\text{g/ml}$), no fotoperíodo de 8h (figura 1-B). Não ocorreram diferenças significativas, entre os tratamentos, para este parâmetro no fotoperíodo de 18h, entretanto a porcentagem de clorose nos explantes cultivados neste fotoperíodo foi significativamente maior, ao nível de 5%, à ocorrência nos explantes em 8h (figura 7).

2-Efeito das combinações de BA com GA₃

O fitorregulador BA (0,01 e 0,1 $\mu\text{g/ml}$) sozinho e combinado com GA₃ (0,1 e 1,0 $\mu\text{g/ml}$) apresentou efeitos significativamente maiores, ao nível de 0,1%, em ambos fotoperíodos, sobre a formação de calo na base do explante (figura 14) e de brotos (figura 12) e na inibição de formação de raízes (figura 11).

Nos explantes em GA₃ sozinho os resultados foram semelhantes ao controle, com raízes e sem formação de calo.

O comprimento do eixo principal dos explantes cultivados nos meios com GA₃ (0,1 e 1,0 µg/ml), sozinho e combinado com BA (0,01 µg/ml), foi maior que nos explantes do controle. Os explantes cultivados em BA (0,1 µg/ml) combinado com GA₃ (0,1 e 1,0 µg/ml) apresentaram o comprimento do eixo principal significativamente menor, ao nível de 0,1% no fotoperíodo de 8h e de 1% em 18h, em relação aos outros tratamentos (figura 10), calo mais espesso e maior número de brotos (figura 9).

O número de folhas e a expansão foliar não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, com os explantes apresentando mais de dez folhas e com expansão média. Houve uma tendência maior de clorose nas folhas dos explantes em meio com o BA sozinho (0,1 µg/ml) e combinado com GA₃ (0,1 µg/ml). No fotoperíodo de 18h a porcentagem de clorose foi significativamente maior (figura 13).

3-Efeito das combinações de BA com CCC

O fitorregulador de crescimento BA (0,01 e 0,1 µg/ml), sozinho e combinado com CCC (0,1 e 1,0 µg/ml), induziu significativamente a formação de calo (figura 19), de brotos (figura 17) e a clorose das folhas (figura 18). O número de

brotos e a porcentagem de clorose foram significativamente maiores, ao nível de 5%, no fotoperíodo de 18h.

O comprimento do eixo principal foi significativamente maior, ao nível de 1%, no meio com BA (0,01 µg/ml) sozinho no fotoperíodo de 8h; no fotoperíodo de 18h foi maior, ao nível de 5%, em BA (0,1 µg/ml) combinado com CCC (1,0 µg/ml) (figura 15).

Os valores para o número e comprimento das raízes foram maiores nos meios com BA sozinho e combinado com CCC, sendo significativamente maiores, ao nível de 1% no fotoperíodo de 8h, quando sozinho (0,01 µg/ml) e, ao nível de 0,1% no fotoperíodo de 18h, quando sozinho (0,01 µg/ml) e combinado com CCC (1,0 µg/ml) (figura 16).

O número de folhas e a expansão foliar não apresentaram diferenças significativas nos diferentes tratamentos, com os explantes apresentando mais de dez folhas e média expansão destas.

4-Efeito das combinações de BA e de cinetina com ANA

Os meios contendo BA (0,01 µg/ml) sozinho e combinado com ANA (0,01 µg/ml) foram indutores do crescimento em comprimento do eixo principal, em ambos fotoperíodos (figura 20), com diferenças significativas, ao nível de 0,1%, em relação aos

outros tratamentos. O mesmo resultado foi obtido para o número e comprimento das raízes, com valores significativamente maiores nestes meios (figura 21). A combinação cinetina (0,01 µg/ml) e ANA (0,01 µg/ml) também induziu o número e comprimento das raízes.

A combinação BA (0,005 µg/ml) e ANA (0,1 µg/ml) determinou um número e comprimento menor de raízes e número de folhas, sendo o número de folhas significativamente menor, ao nível de 5% em fotoperíodo de 8h, em relação aos demais tratamentos (figura 22 e 23).

Nos explantes cultivados nos meios com BA e ANA, sozinhos e combinados nas diferentes concentrações, houve formação de calo, sendo significativamente maior, ao nível de 0,1% em ambos fotoperíodos, com relação aos demais tratamentos, nos quais não ocorreu formação de calo (figura 24).

Não houve diferenças significativas quanto à expansão foliar entre os tratamentos e não ocorreu um número significativamente maior de brotos nos explantes cultivados em todos os tratamentos. Ocorreu clorose em alguns explantes cultivados em meio com ANA (0,1 µg/ml) sozinho e com BA (0,005 µg/ml e 0,01 µg/ml) sozinho ou combinado com ANA (0,01 e 0,1 µg/ml) nos fotoperíodos de 8 e de 18h, sem apresentar diferenças significativas com relação aos demais tratamentos.

Os valores para o comprimento da estaca e da expansão foliar foram significativamente maiores, ao nível de 5%, nos explantes cultivados em 8h em relação aos cultivados em 18h.

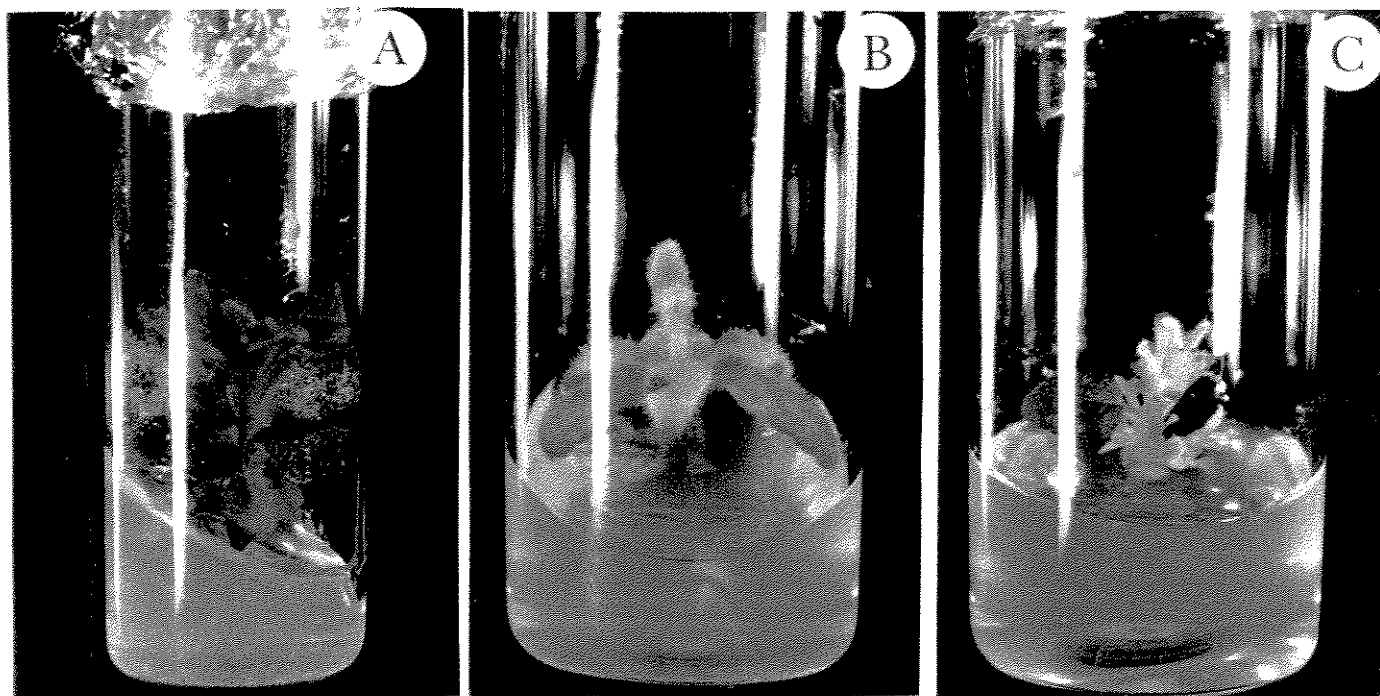


Figura 1. Efeito das diferentes combinações dos fitorreguladores BA e cinetina com AIA sobre o crescimento e a morfogênese *in vitro* dos explantes de *S. allagophylla*: (A) BA (0,01 $\mu\text{l/ml}$); (B) cinetina (0,1 $\mu\text{g/ml}$) combinada com AIA (0,01 $\mu\text{g/ml}$) e (C) BA (0,1 $\mu\text{g/ml}$) combinado com AIA (0,01 $\mu\text{g/ml}$).

Figura 2. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) e de cinetina (0,01 e 0,1 µg/ml) com AIA (0,0; 0,1 µg/ml) sobre o parâmetro comprimento do eixo principal (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 5% para os tratamentos em fotoperíodo de 8h e ao nível de 0,1% (teste de Duncan) em 18h. Não houve diferenças significativas entre os resultados dos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e AIA:	BA 0,01 ug/ml e AIA:	BA 0,1 ug/ml e AIA:	KIN 0,01 ug/ml e AIA:	KIN 0,1 ug/ml e AIA:
□ 0,0	□ 0,0	■ 0,0	□ 0,0	□ 0,0
■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01

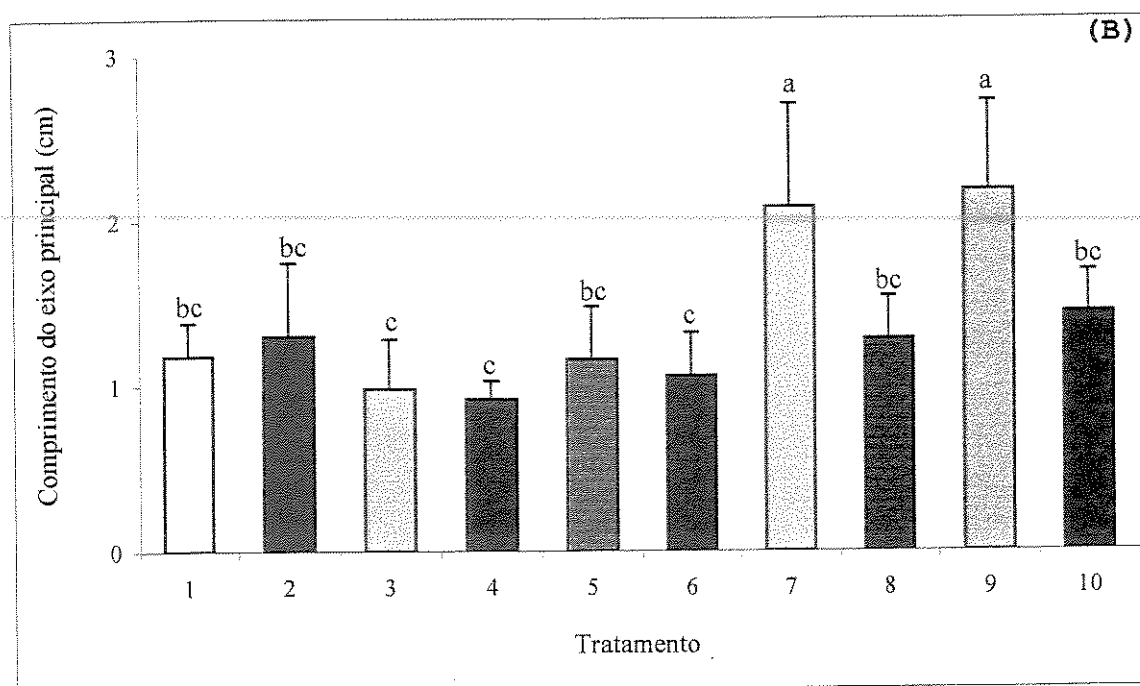
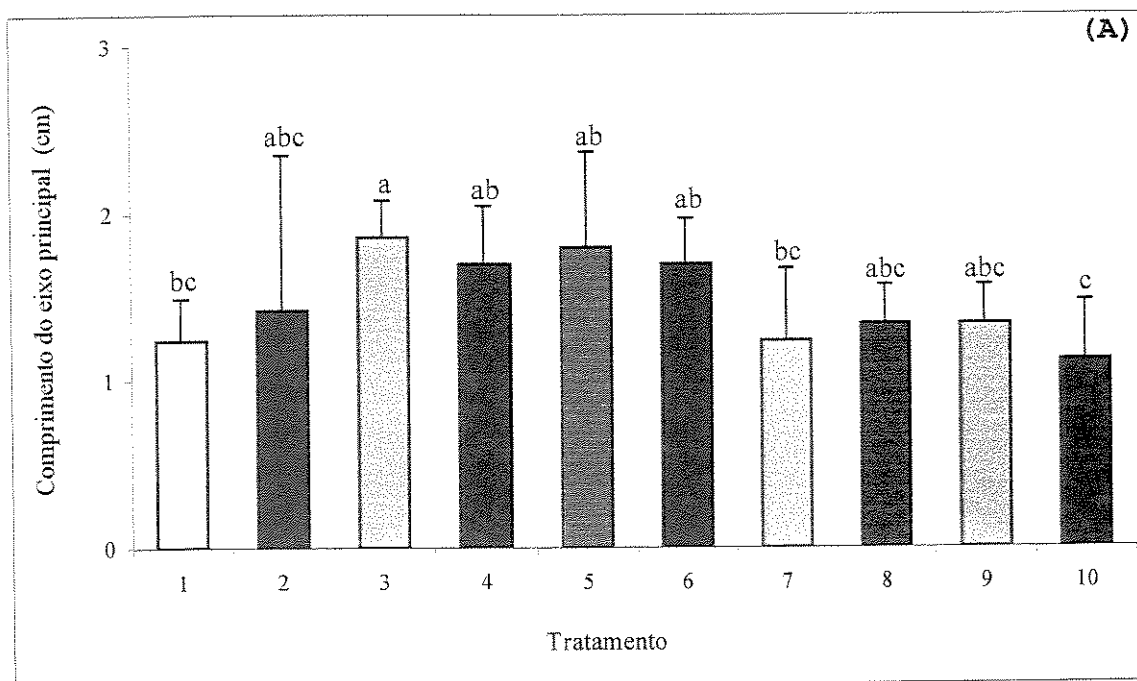


Figura 3. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) e de cinetina (0,01 e 0,1 µg/ml) com AIA (0,0; 0,1 µg/ml) sobre o parâmetro número de raízes (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro - 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=acima de 15 raízes. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% para os tratamentos em fotoperíodo de 8h e ao nível de 5% em 18h (teste de Duncan). Não houve diferenças significativas entre os resultados dos fotoperíodos de 8h e 18h. Resultados do parâmetro comprimento das raízes foi semelhante.

BA 0,0 ug/ml e AIA:	BA 0,01ug/ml e AIA:	BA 0,1 ug/ml e AIA:	KIN 0,01ug/ml e AIA:	KIN 0,1ug/ml e AIA:
□ 0,0	▨ 0,0	■ 0,0	□ 0,0	▨ 0,0
■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01

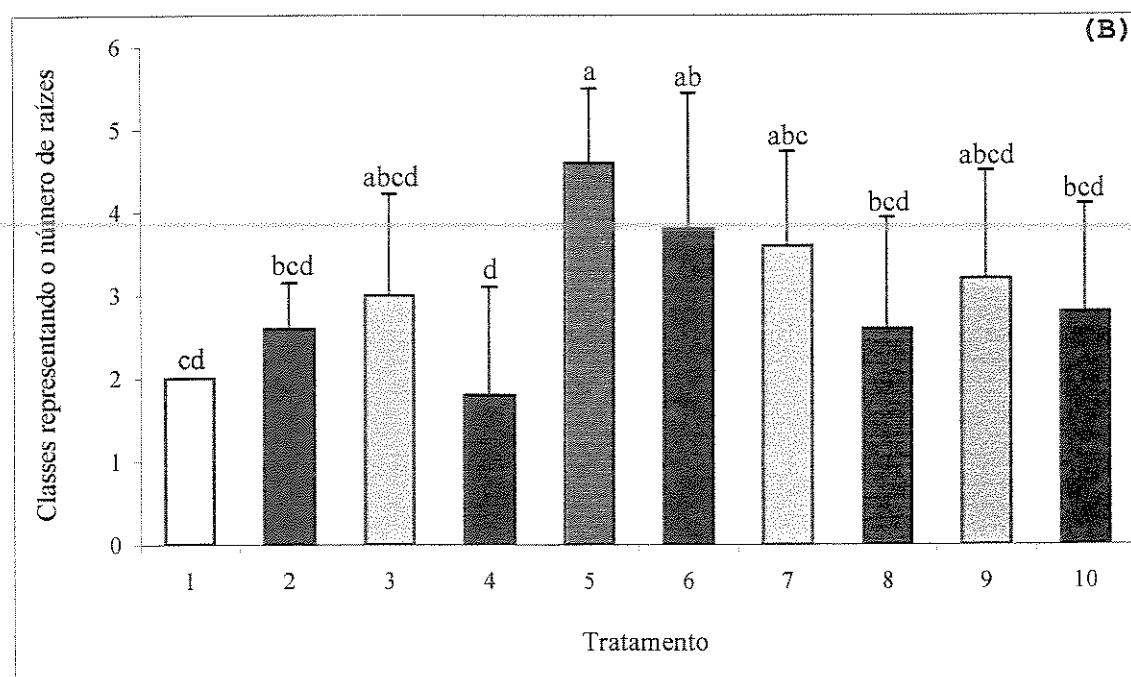
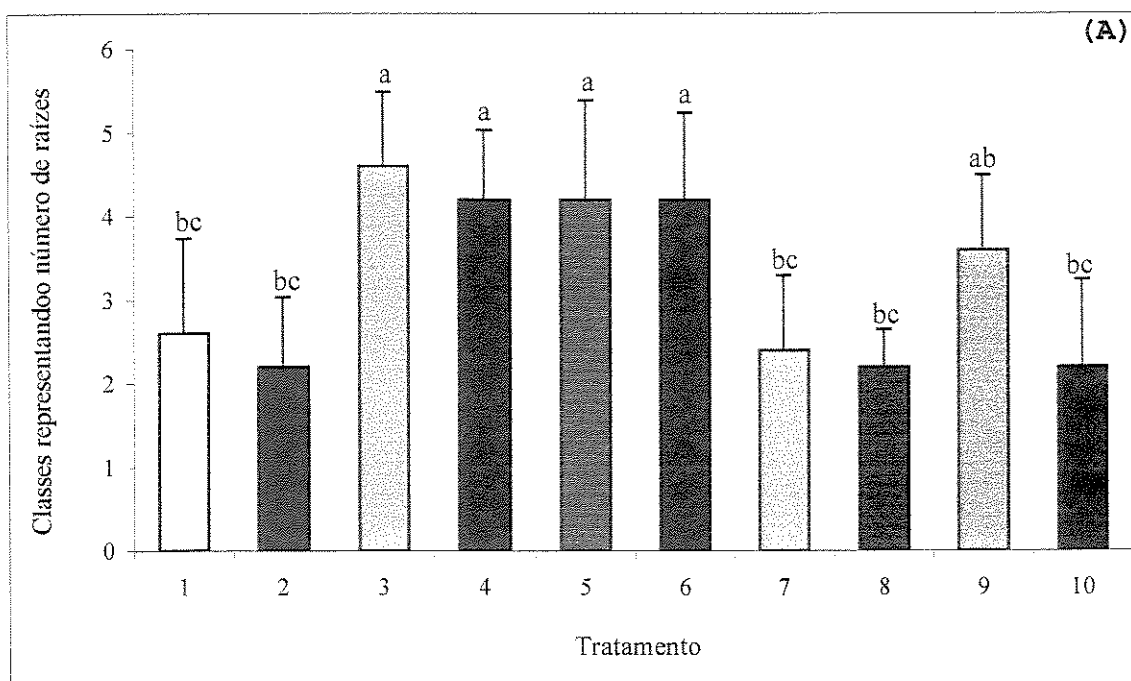


Figura 4. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,01 e 0,1 $\mu\text{g/ml}$) e de cinetina (0,01 e 0,1 $\mu\text{g/ml}$) com AIA (0,0; 0,1 $\mu\text{g/ml}$) sobre o parâmetro número de folhas (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro - 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=acima de 15 folhas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 5% (teste de Duncan) para os tratamentos em 18h. Não houve diferenças significativas entre os resultados dos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e AIA:	BA 0,01ug/ml e AIA:	BA 0,0 ug/ml e AIA:	KIN 0,01ug/ml e AIA:	KIN 0,1ug/ml e AIA:
□ 0,0	□ 0,0	■ 0,0	□ 0,0	□ 0,0
■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01

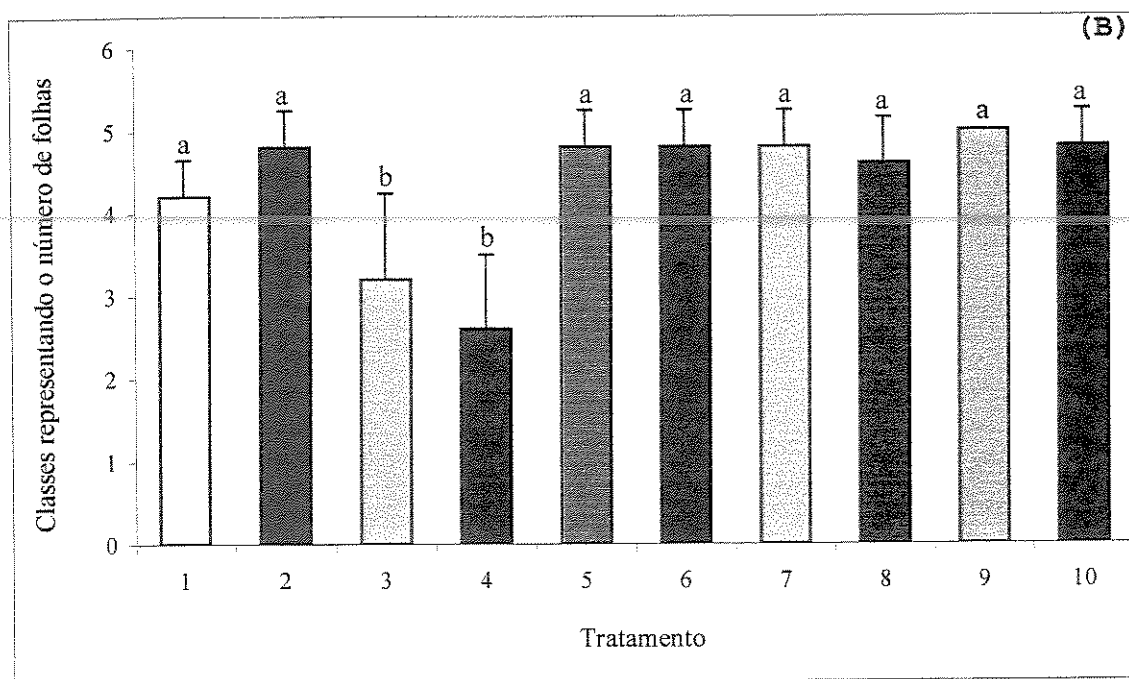
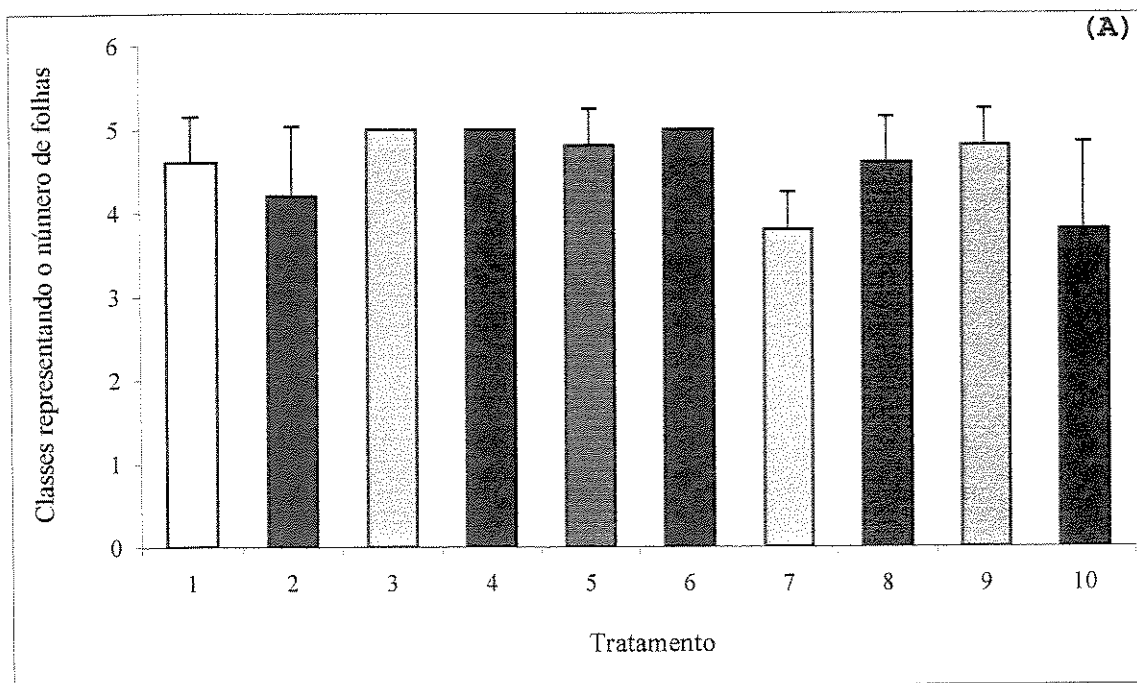


Figura 5. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) e de cinetina (0,01 e 0,1 µg/ml) com AIA (0,0; 0,1 µg/ml) sobre o parâmetro expansão foliar (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro - 1=pouca expansão (área de 9-38 mm²); 2:média expansão (38-66 mm²) e 3:grande expansão (66-94 mm²). Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan) para os tratamentos em 8h e ao nível de 5% em 18h. Não houve diferenças significativas entre os resultados dos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e AIA:	BA 0,01ug/ml e AIA:	BA 0,1 ug/ml e AIA:	KIN 0,01ug/ml e AIA:	KIN 0,1ug/ml e AIA:
□ 0,0	□ 0,0	■ 0,0	□ 0,0	□ 0,0
■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01

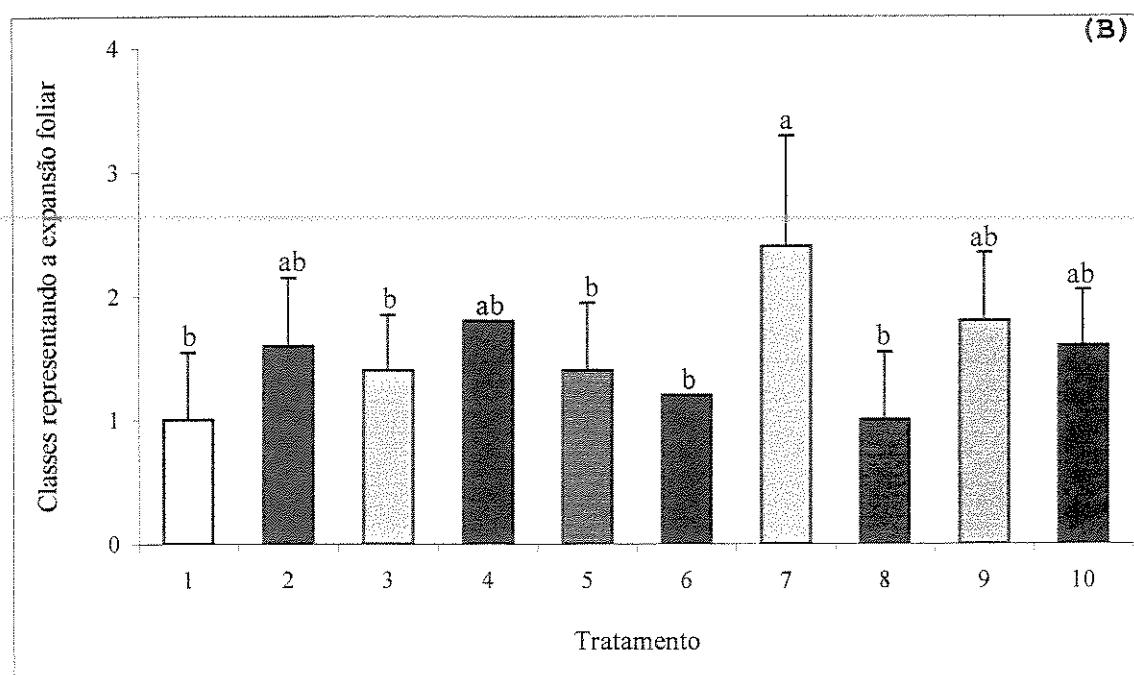
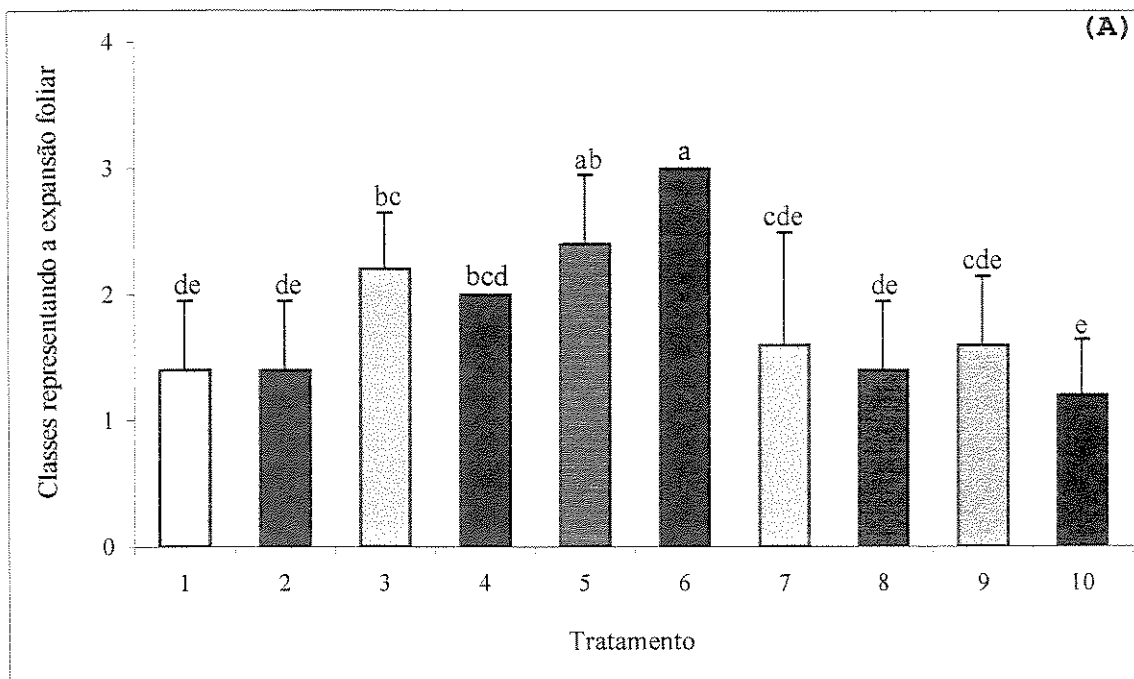


Figura 6. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) e de cinetina (0,01 e 0,1 µg/ml) com AIA (0,0; 0,1 µg/ml) sobre o parâmetro número de brotos (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro - 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=acima de 15 brotos. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan) para os tratamentos em ambos fotoperíodos. Não houve diferenças significativas entre os resultados dos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e AIA:	BA 0,01ug/ml e AIA:	BA 0,1 ug/ml e AIA:	KIN 0,01ug/ml e AIA:	KIN 0,1ug/ml e AIA:
□ 0,0	□ 0,0	■ 0,0	□ 0,0	□ 0,0
■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01

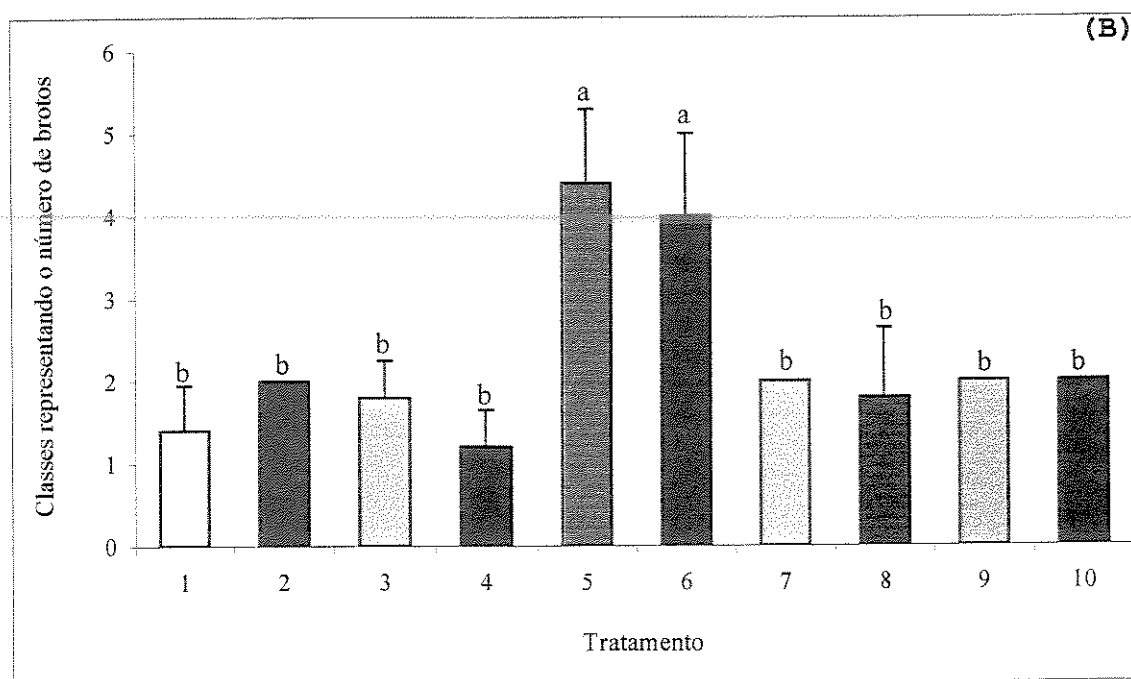
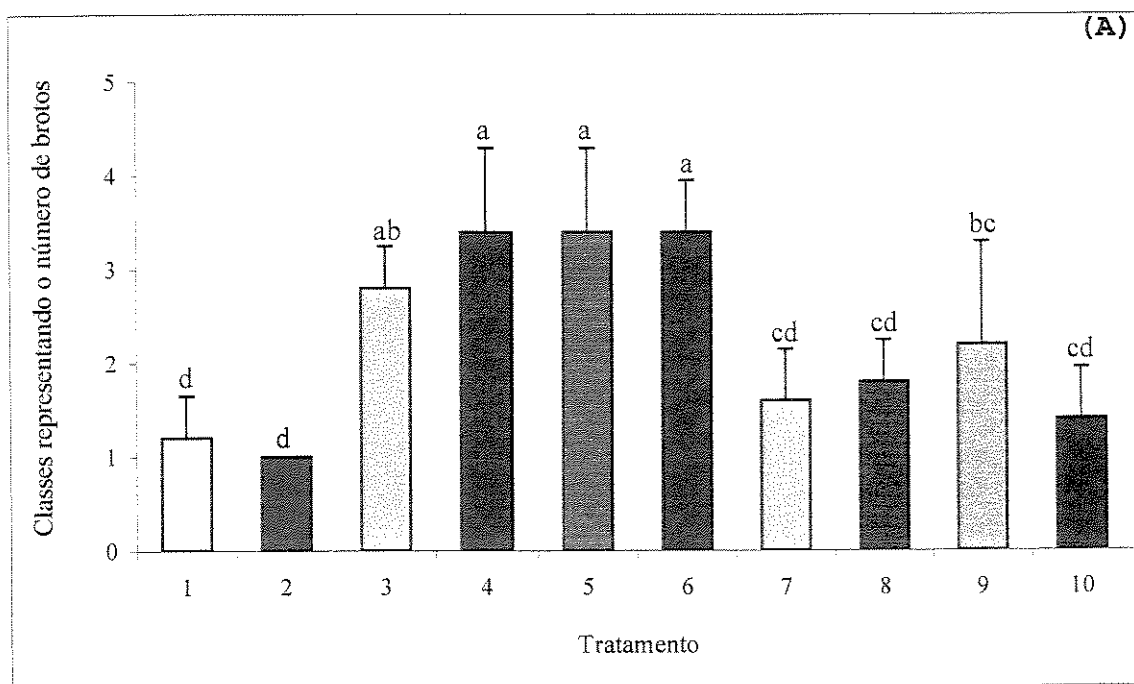


Figura 7. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) e de cinetina (0,01 e 0,1 µg/ml) com AIA (0,0; 0,1 µg/ml) sobre o parâmetro porcentagem de clorose (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro - 1= 0%; 2=5 a 10%; 3=10 a 20%; 4=20 a 50%; 5=50 a 70% e 6=70 a 100% de clorose. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 1% (teste de Duncan) para os tratamentos em fotoperíodo de 8h. Houve diferenças significativas ao nível de 5% entre a média dos resultados dos tratamentos nos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e AIA:	BA 0,01ug/ml e AIA:	BA 0,1 ug/ml e AIA:	KIN 0,0ug/ml e AIA:	KIN 0,1ug/ml e AIA:
□ 0,0	□ 0,0	■ 0,0	□ 0,0	□ 0,0
■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01

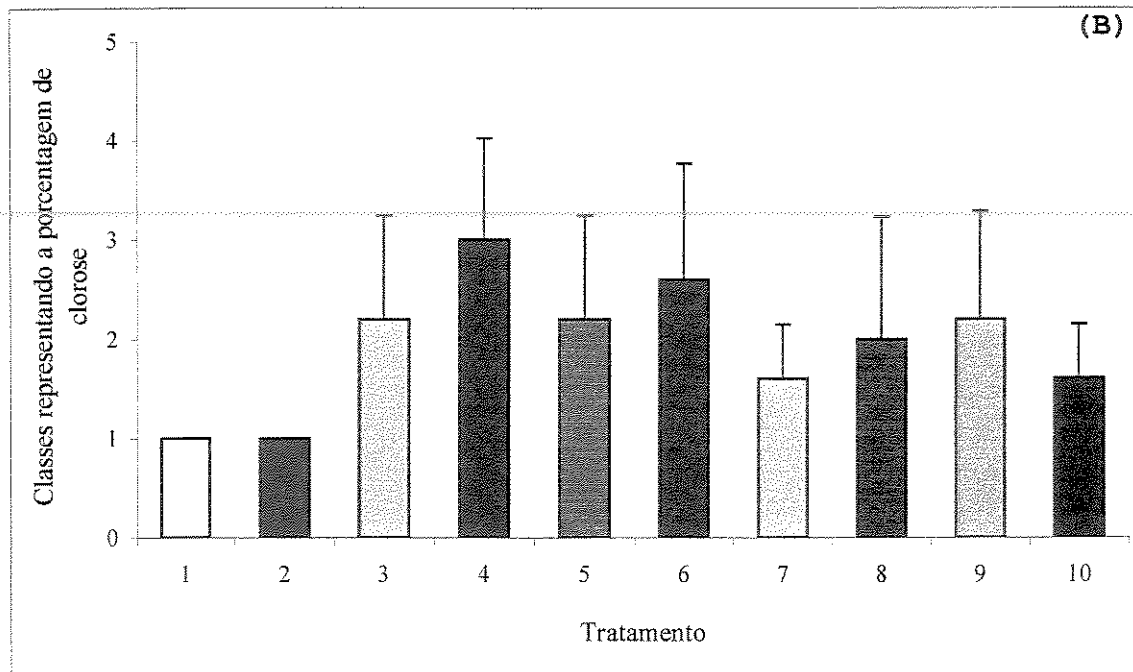
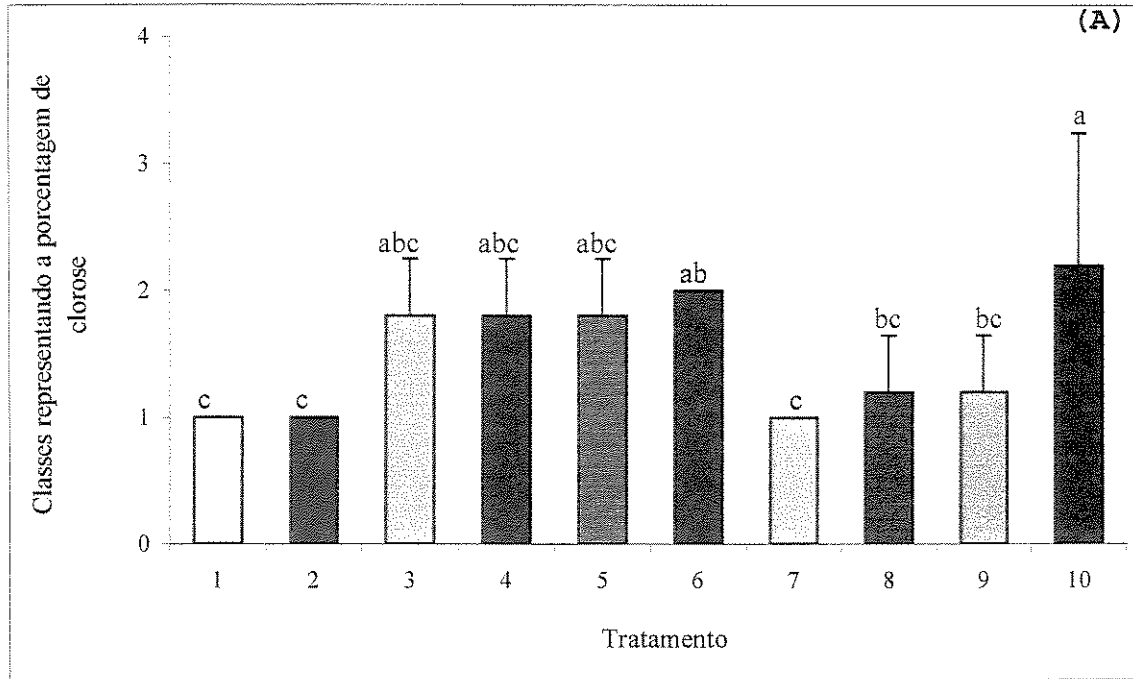
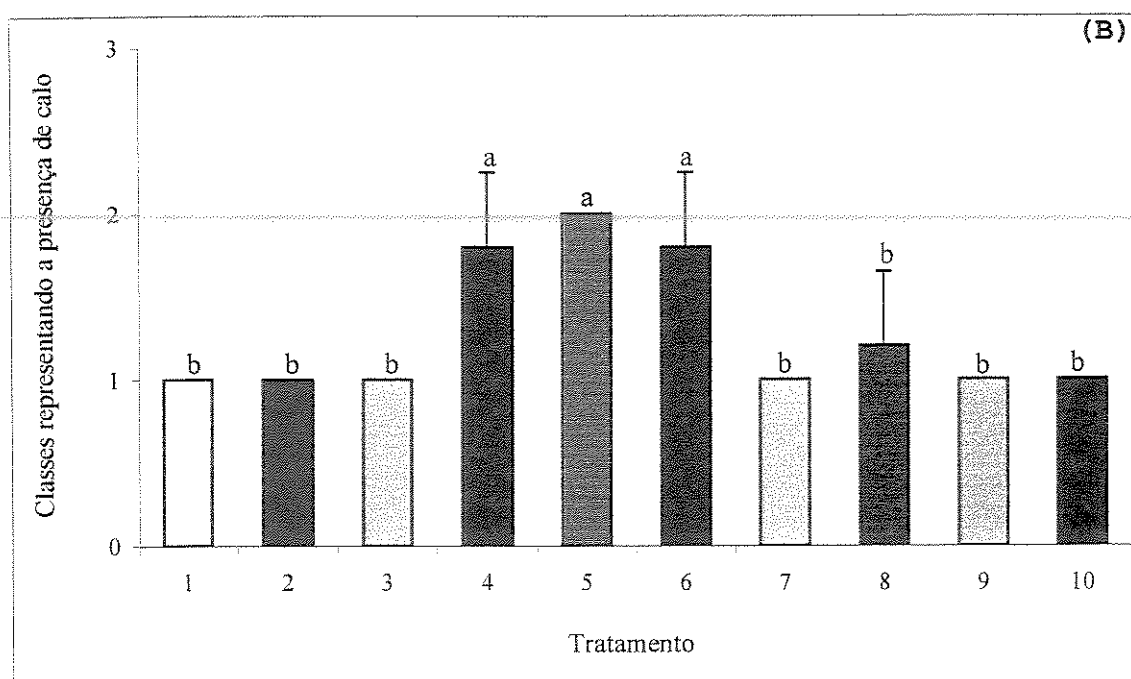
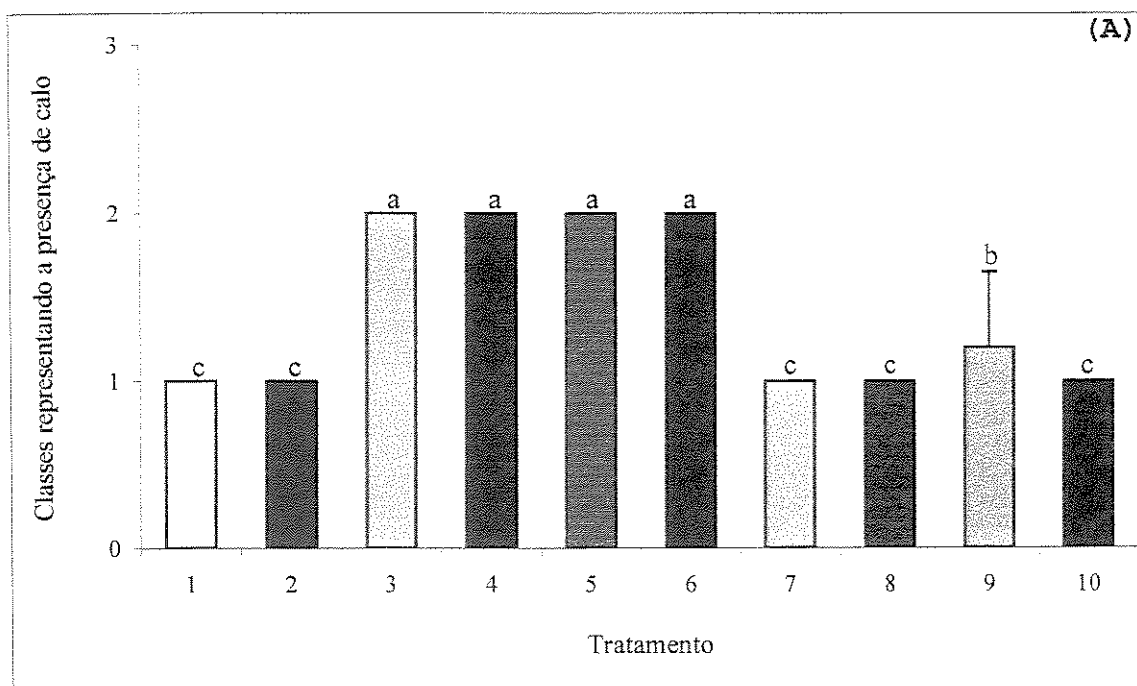


Figura 8. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) e de cinetina (0,01 e 0,1 µg/ml) com AIA (0,0; 0,1 µg/ml) sobre o parâmetro presença de calo (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h. Classes dos valores do parâmetro: 1= calo não presente e 2= calo presente. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan) para os tratamentos em ambos fotoperíodos. Não houve diferenças significativas entre os resultados dos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e AIA:	BA 0,01 ug/ml e AIA:	BA 0,1 ug/ml e AIA:	KIN 0,01 ug/ml e AIA:	KIN 0,1 ug/ml e AIA:
□ 0,0	□ 0,0	■ 0,0	□ 0,0	□ 0,0
■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01	■ 0,01



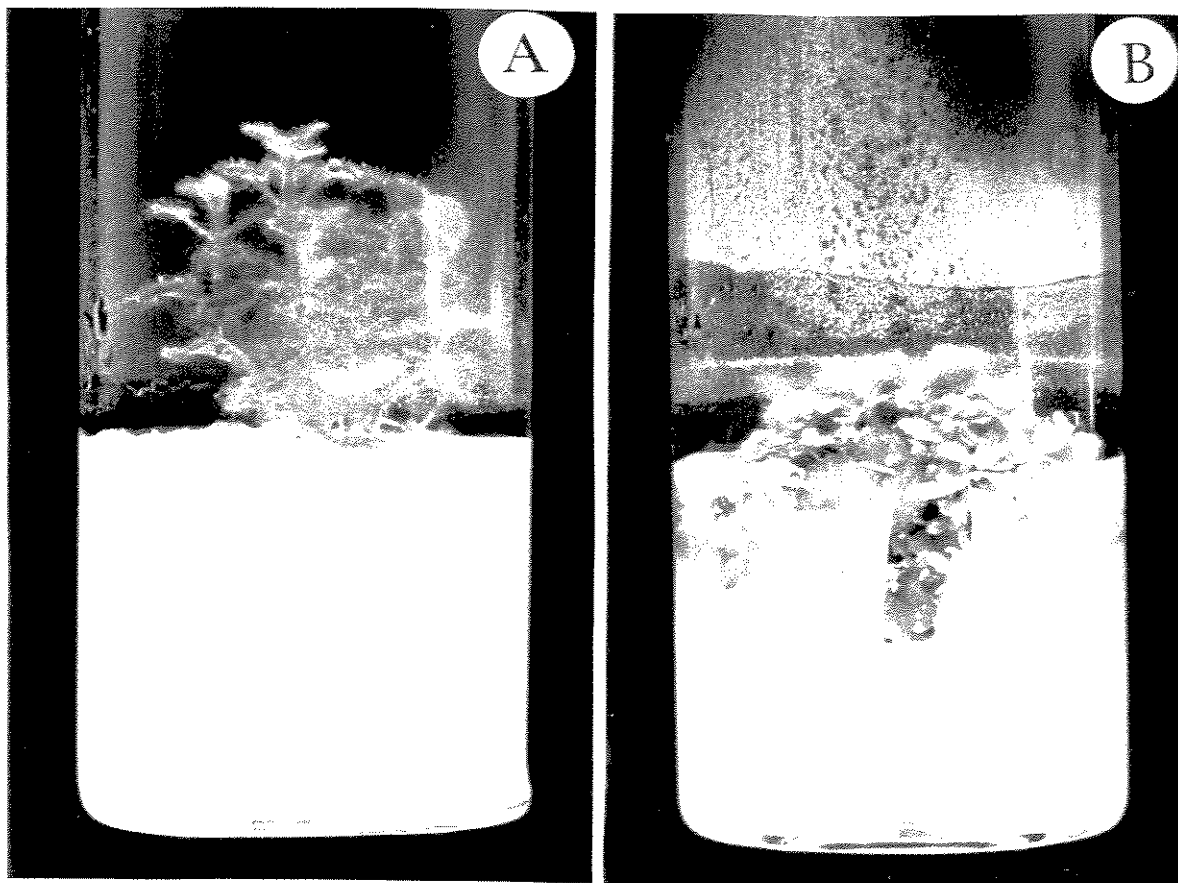


Figura 9. Efeito das diferentes combinações dos fitorreguladores BA e GA₃ sobre o crescimento e a morfogênese *in vitro* dos explantes de *S. allagophylla*: (A) BA (0,01µg/ml) combinado GA₃ (0,1 µg/ml) e (B) BA (0,1 µg/ml) combinado com GA₃ (1,0 µg/ml).

Figura 10. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) com GA₃ (0,0; 0,1 e 1,0 µg/ml) sobre o parâmetro comprimento do eixo principal (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan) para os tratamentos no fotoperíodo de 8h e ao nível 1% em 18h. Não houve diferenças significativas entre os resultados dos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e GA	BA 0,01ug/ml e GA	BA 0,1 ug/ml e GA
□ 0,0	□ 0,0	□ 0,0
■ 0,1	■ 0,1	■ 0,1
■ 1,0	■ 1,0	■ 1,0

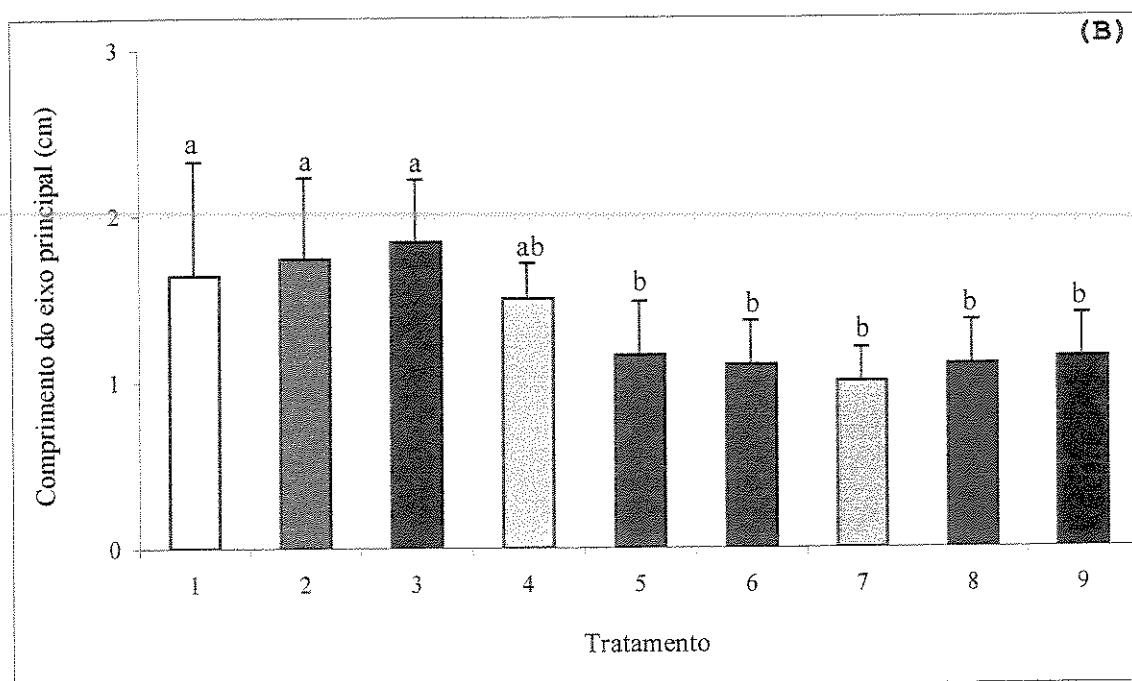
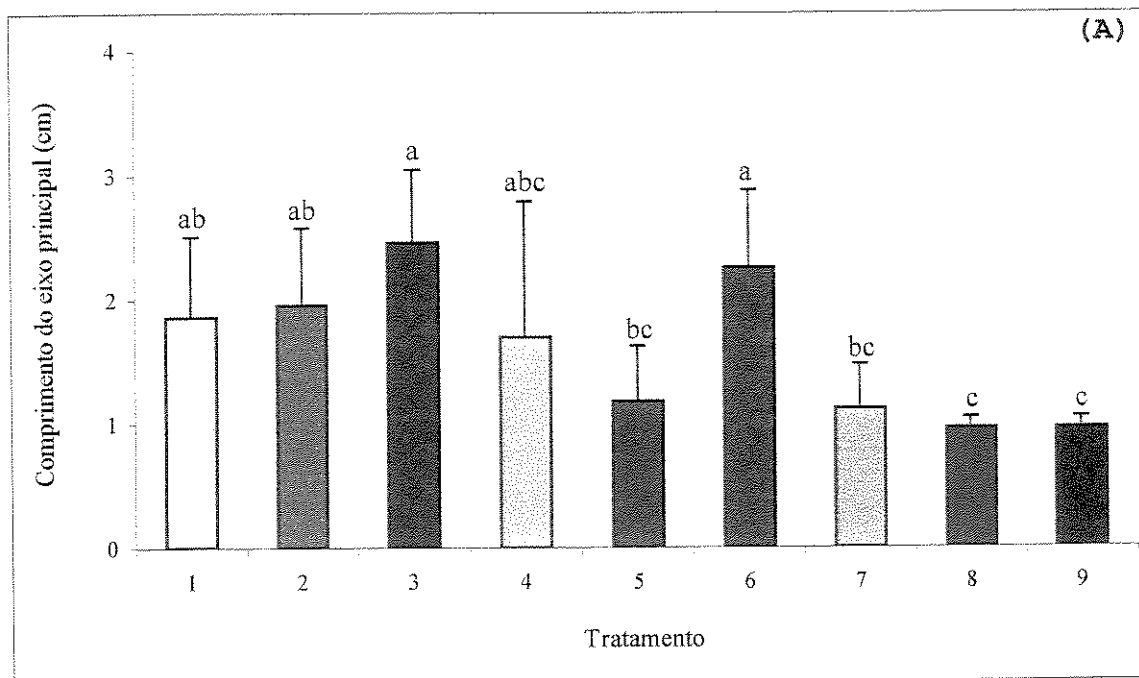


Figura 11. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) com GA₃ (0,0; 0,1 e 1,0 µg/ml) sobre o parâmetro número de raízes (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro - 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=acima de 15 raízes. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan) para os tratamentos no fotoperíodo de 8h e ao nível 1% em 18h. Não houve diferenças significativas entre os resultados dos fotoperíodos de 8h e 18h. O parâmetro comprimento das raízes apresentou resultados semelhantes.

BA 0,0 ug/ml e GA	BA 0,01ug/ml e GA	BA 0,1 ug/ml e GA
0,0	0,0	0,0
0,1	0,1	0,1
1,0	1,0	1,0

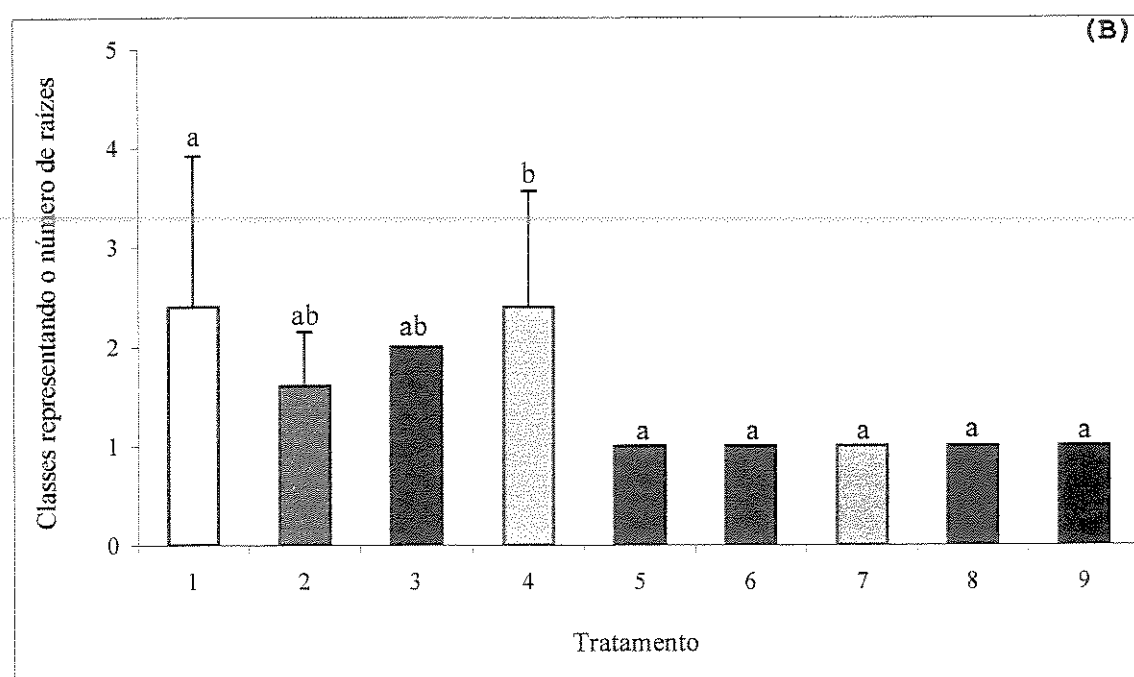
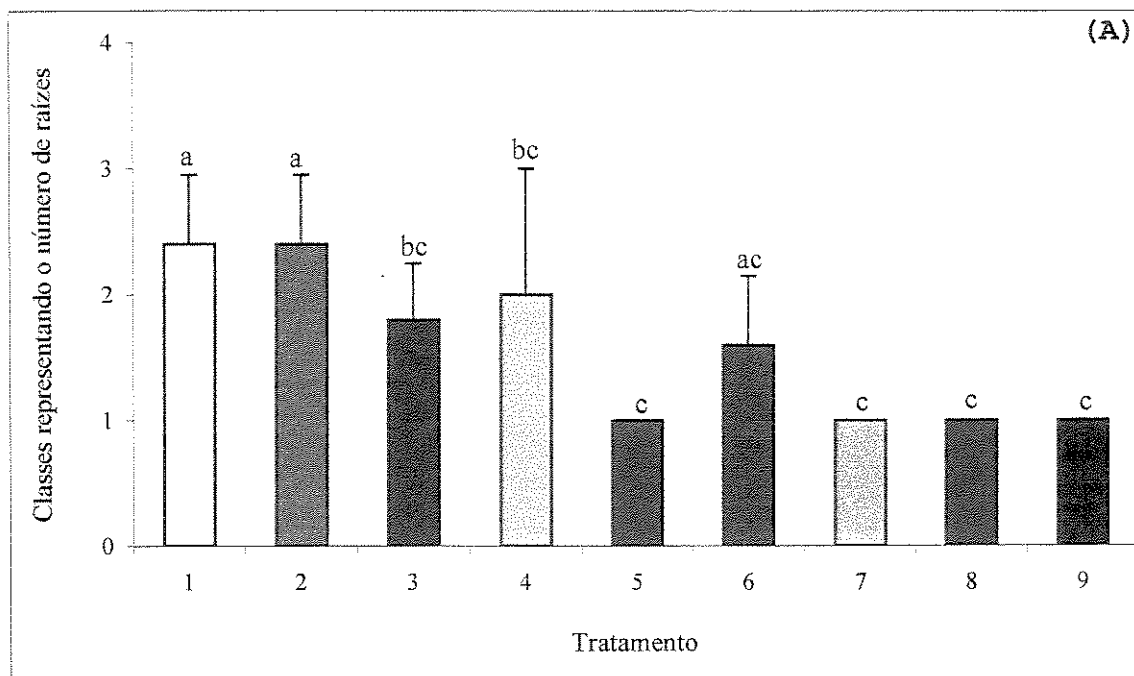


Figura 12. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) com GA₃ (0,0; 0,1 e 1,0 µg/ml) sobre o parâmetro número de brotos (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro - 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=acima de 15 brotos. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan) para os tratamentos em ambos fotoperíodos. Não houve diferenças significativas entre os resultados dos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e GA	BA 0,01 ug/ml e GA	BA 0,1 ug/ml e GA
□ 0,0	▤ 0,0	▥ 0,0
■ 0,1	■ 0,1	■ 0,1
■ 1,0	■ 1,0	■ 1,0

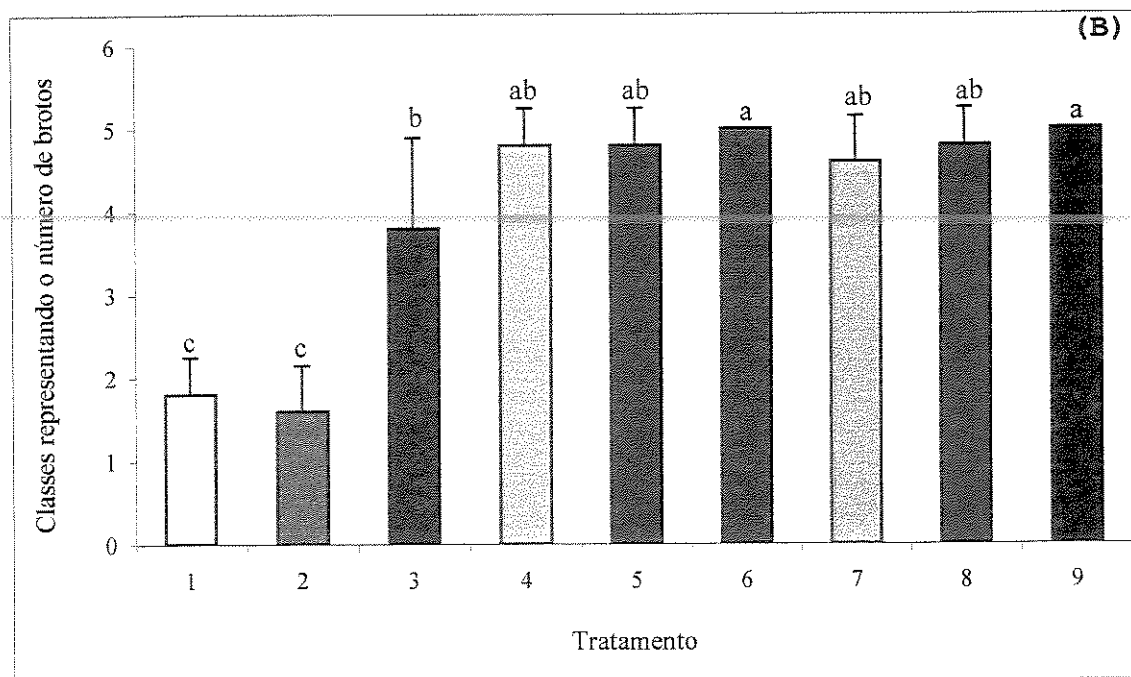
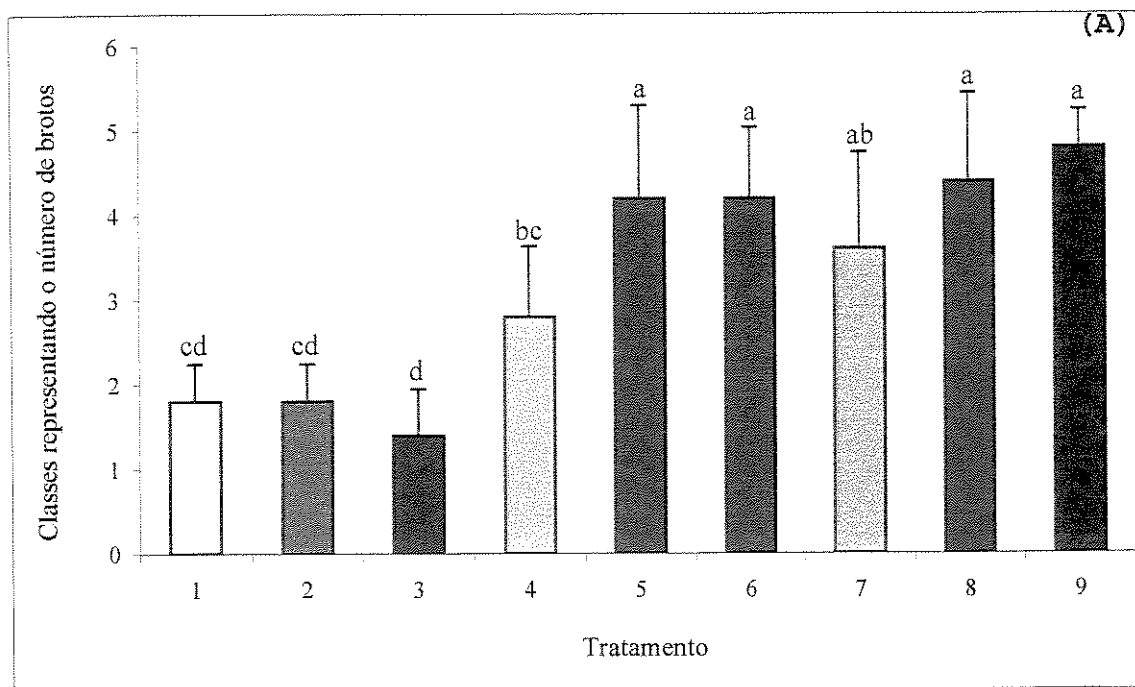


Figura 13. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) com GA₃ (0,0; 0,1 e 1,0 µg/ml) sobre o parâmetro porcentagem de clorose (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro - 1=0%; 2=5 a 10%; 3=10 a 20%; 4=20 a 50%; 5=50 a 70% e 6=70 a 100% de clorose. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan) para os tratamentos no fotoperíodo de 18h. Houve diferenças significativas, ao nível de 5%, entre a média dos resultados dos tratamentos nos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e GA	BA 0,01 ug/ml e GA	BA 0,1 ug/ml e GA
□ 0,0	□ 0,0	□ 0,0
■ 0,1	■ 0,1	■ 0,1
■ 1,0	■ 1,0	■ 1,0

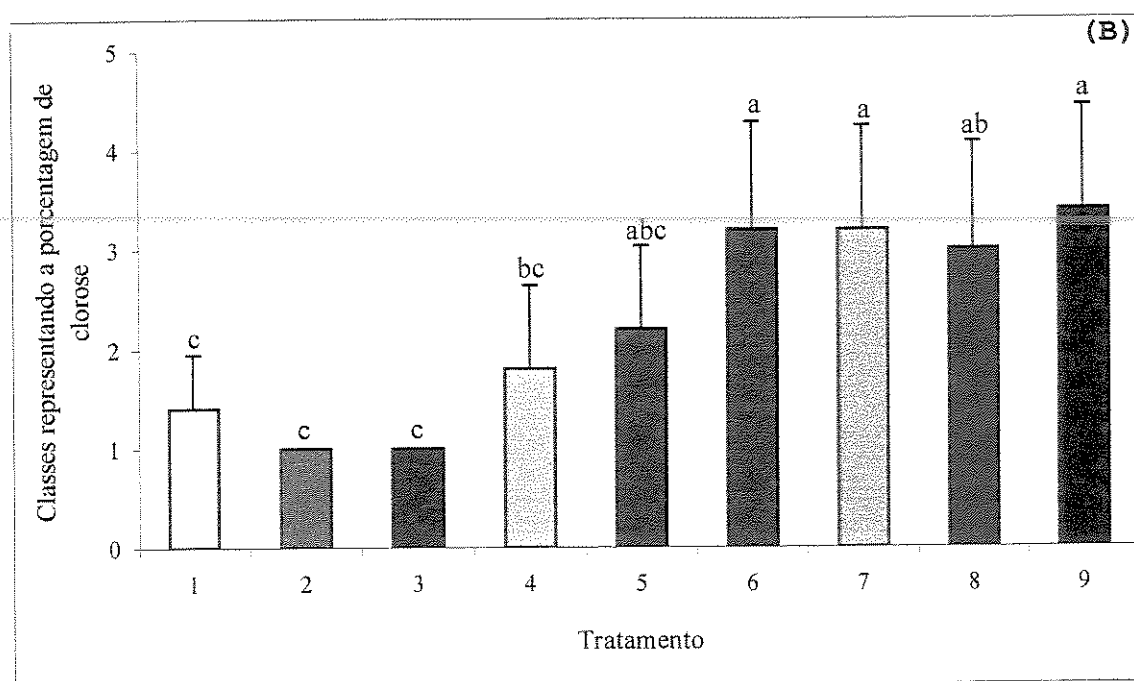
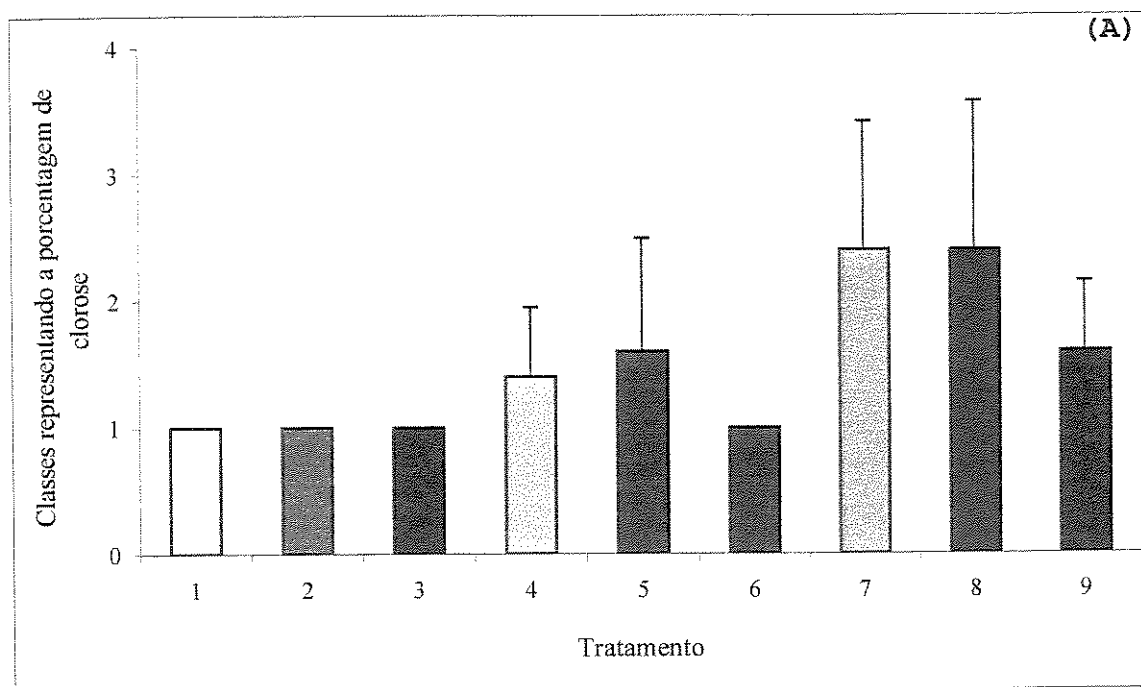


Figura 14. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) com GA₃ (0,0; 0,1 e 1,0 µg/ml) sobre o parâmetro presença de calo (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro - 1= calo não presente e 2= calo presente. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan) para os tratamentos em ambos fotoperíodos. Não houve diferenças significativas entre os resultados dos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e GA	BA 0,01ug/ml e GA	BA 0,1 ug/ml e GA
0,0	0,0	0,0
0,1	0,1	0,1
1,0	1,0	1,0

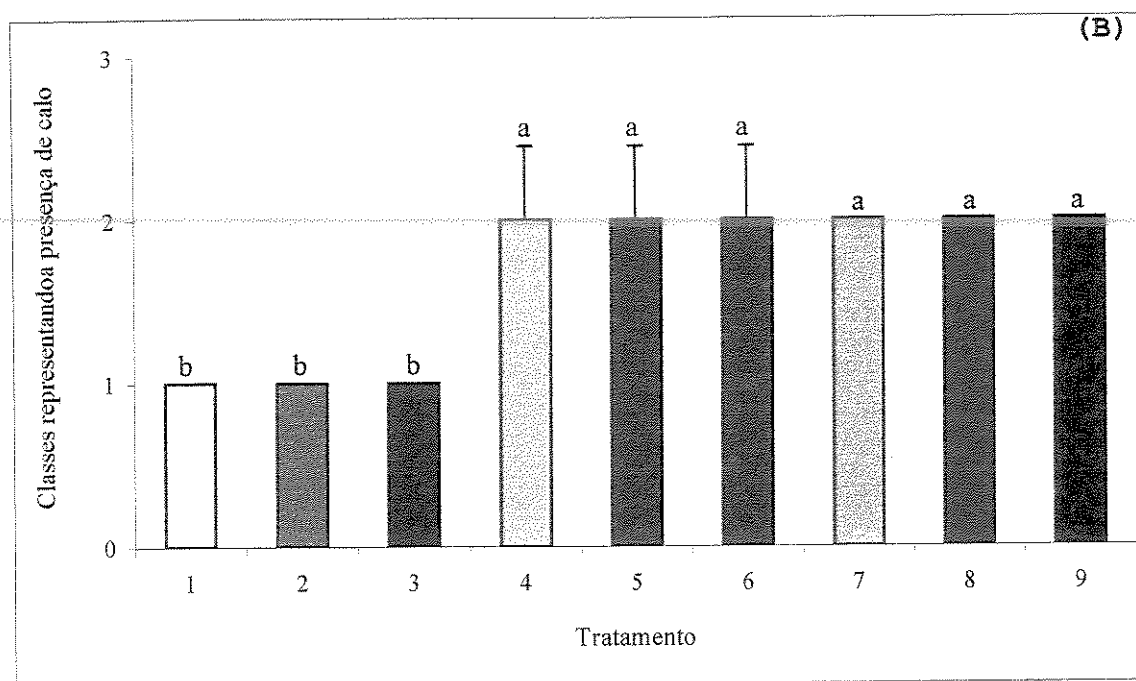
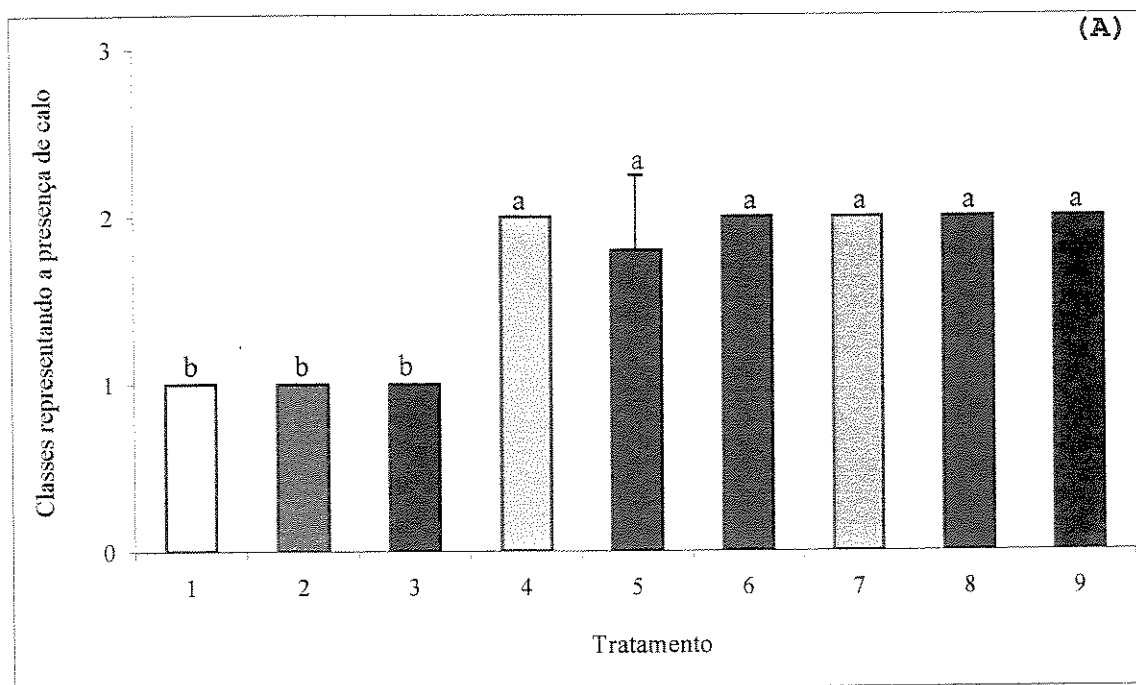


Figura 15. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) com CCC (0,0; 0,1 e 1,0 µg/ml) sobre o parâmetro comprimento do eixo principal (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 1% (teste de Duncan) para os tratamentos em fotoperíodo de 8h e ao nível de 5% em 18h. Houve diferenças significativas, ao nível de 0,1%, entre a média dos resultados dos tratamentos nos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e CCC:	BA 0,01ug/ml e CCC:	BA 0,1ug/ml e CCC:
0,0	0,0	0,0
0,1	0,1	0,1
1,0	1,0	1,0

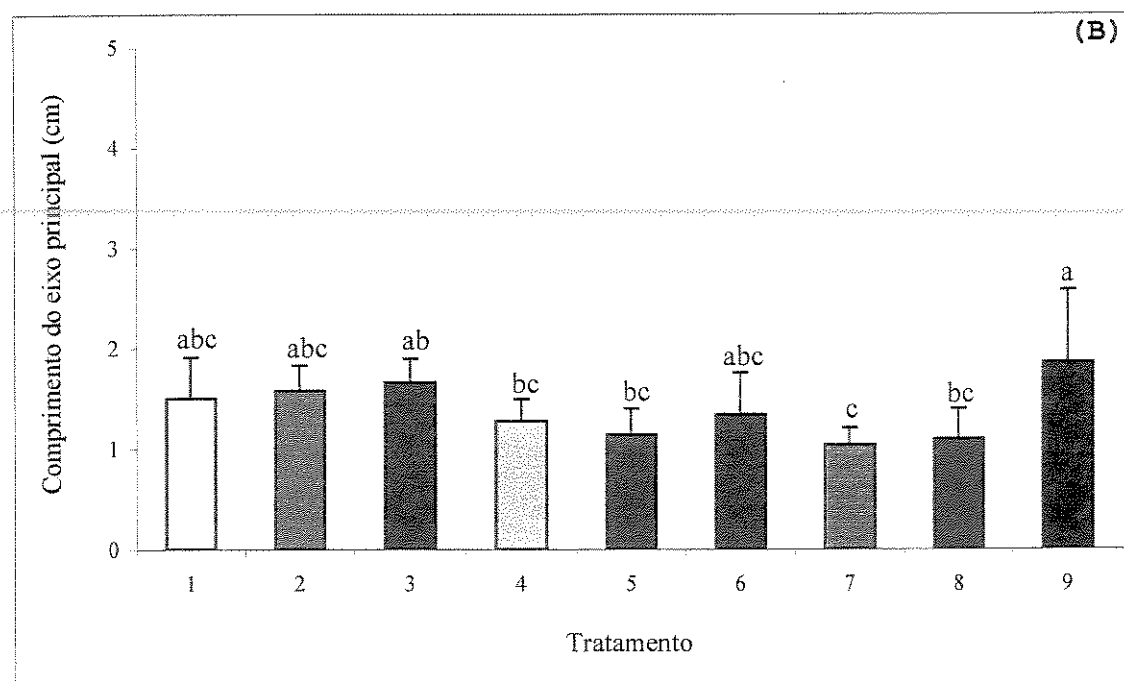
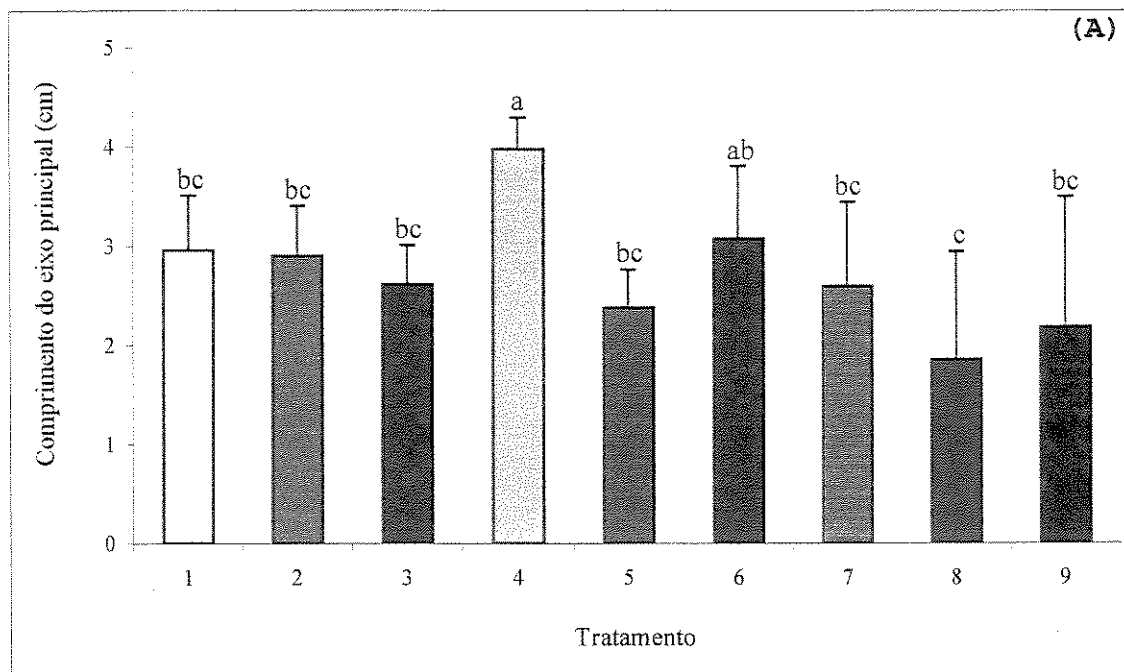


Figura 16. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) com CCC (0,0; 0,1 e 1,0 µg/ml) sobre o parâmetro número de raízes (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro - 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=acima de 15 raízes. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 1% (teste de Duncan) para os tratamentos em fotoperíodo de 8h e ao nível de 0,1% em 18h. Não houve diferenças significativas entre os resultados dos fotoperíodos de 8h e 18h. O parâmetro comprimento das raízes apresentou resultados semelhantes.

BA 0,0 ug/ml e CCC:	BA 0,01ug/ml e CCC:	BA 0,1 ug/ml e CCC:
0,0	0,0	0,0
0,1	0,1	0,1
1,0	1,0	1,0

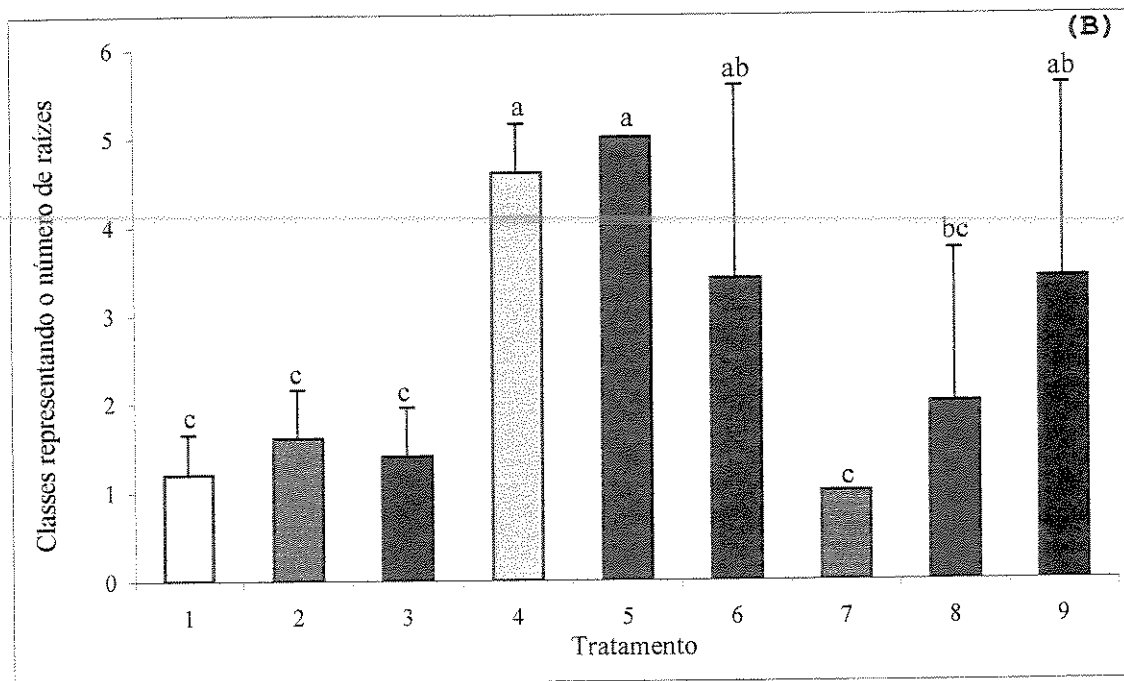
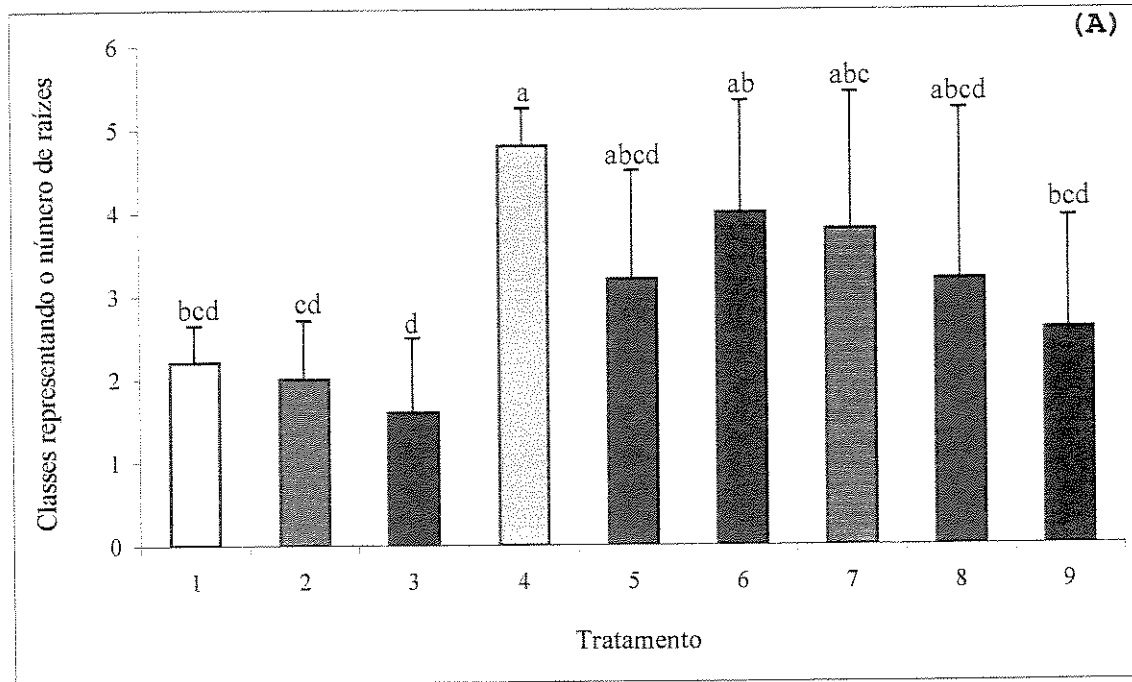


Figura 17. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) com CCC (0,0; 0,1 e 1,0 µg/ml) sobre o parâmetro número de brotos (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro - 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=acima de 15 brotos. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 5% (teste de Duncan) para os tratamentos em fotoperíodo de 8h e ao nível de 1% em 18h. Houve diferenças significativas, ao nível de 5%, entre os resultados dos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e CCC:	BA 0,01 ug/ml e CCC:	BA 0,1 ug/ml e CCC:
□ 0,0	□ 0,0	■ 0,0
■ 0,1	■ 0,1	■ 0,1
■ 1,0	■ 1,0	■ 1,0

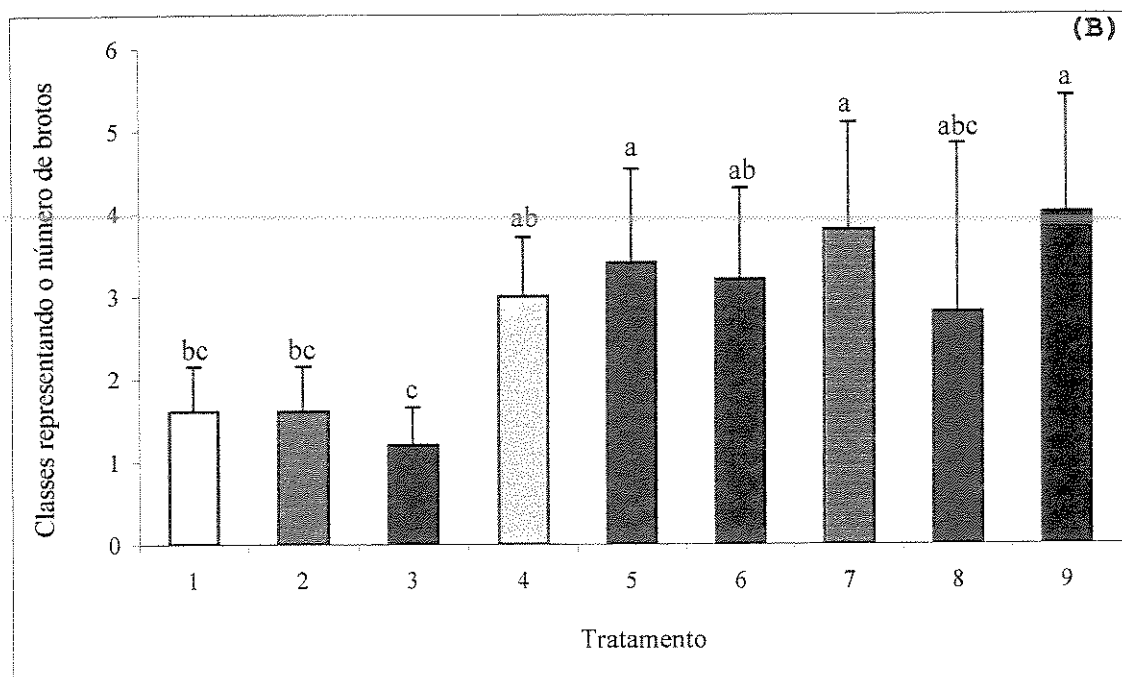
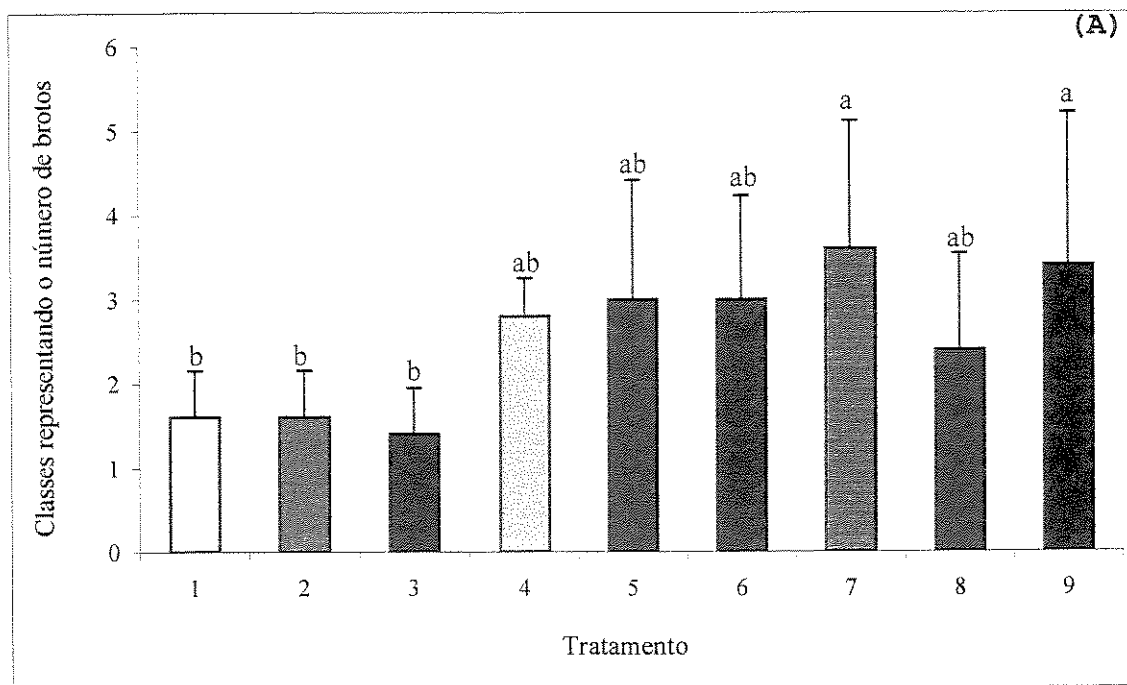


Figura 18. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) com CCC (0,0; 0,1 e 1,0 µg/ml) sobre o parâmetro porcentagem de clorose (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro - 1=0%; 2=5 a 10%; 3=10 a 20%; 4=20 a 50%; 5=50 a 70% e 6=70 a 100% de clorose. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan) para os tratamentos em ambos fotoperíodos. Houve diferenças significativas, ao nível de 5%, entre a média dos resultados dos tratamentos nos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e CCC:	BA 0,01ug/ml e CCC:	BA 0,1 ug/ml e CCC:
0,0	0,0	0,0
0,1	0,1	0,1
1,0	1,0	1,0

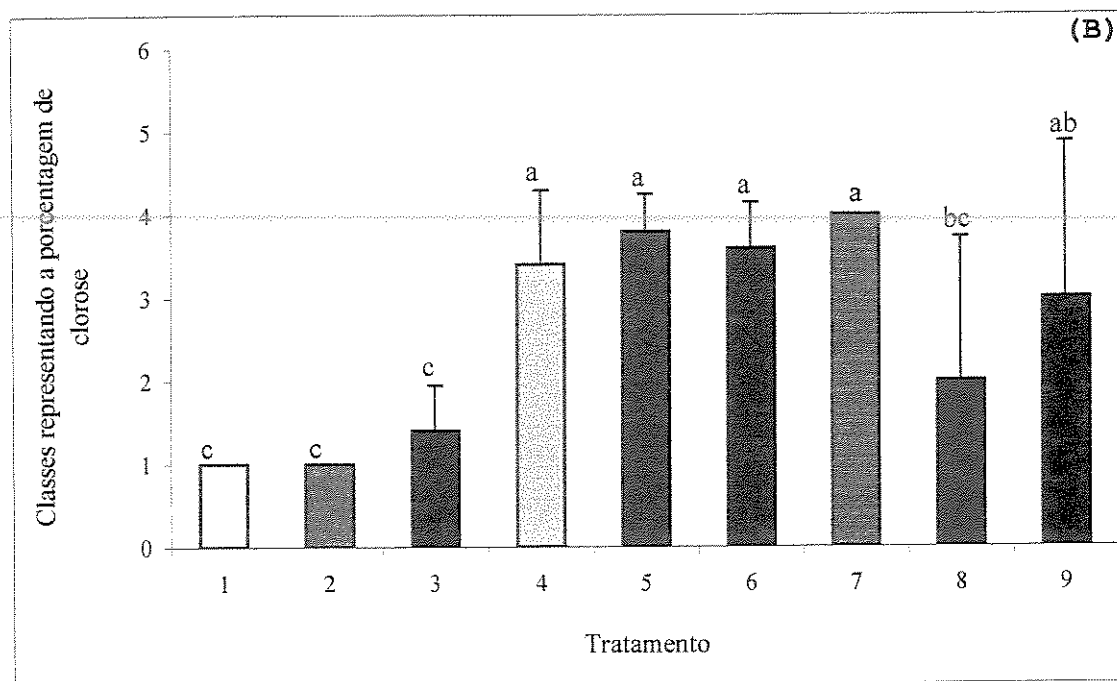
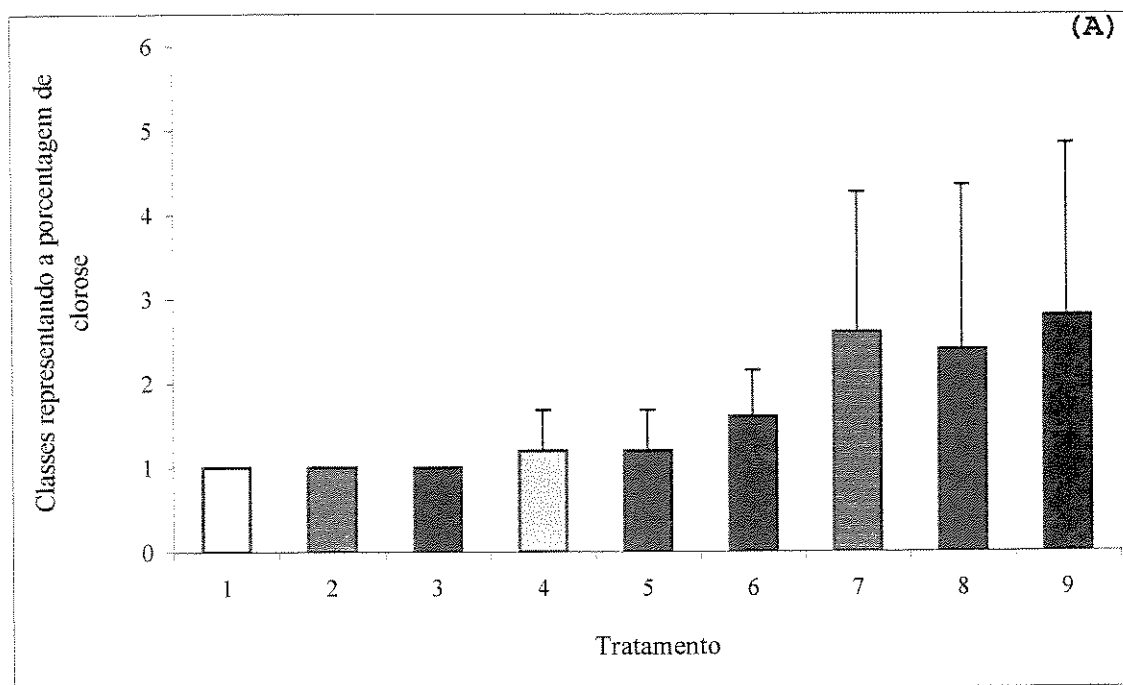


Figura 19. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) com CCC (0,0; 0,1 e 1,0 µg/ml) sobre o parâmetro presença de calo (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro- 1= calo não presente; 2= calo presente. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan) para os tratamentos em ambos fotoperíodos. Não houve diferenças significativas entre os resultados dos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e CCC:	BA 0,01 ug/ml e CCC:	BA 0,1 ug/ml e CCC:
□ 0,0	□ 0,0	■ 0,0
■ 0,1	■ 0,1	■ 0,1
■ 1,0	■ 1,0	■ 1,0

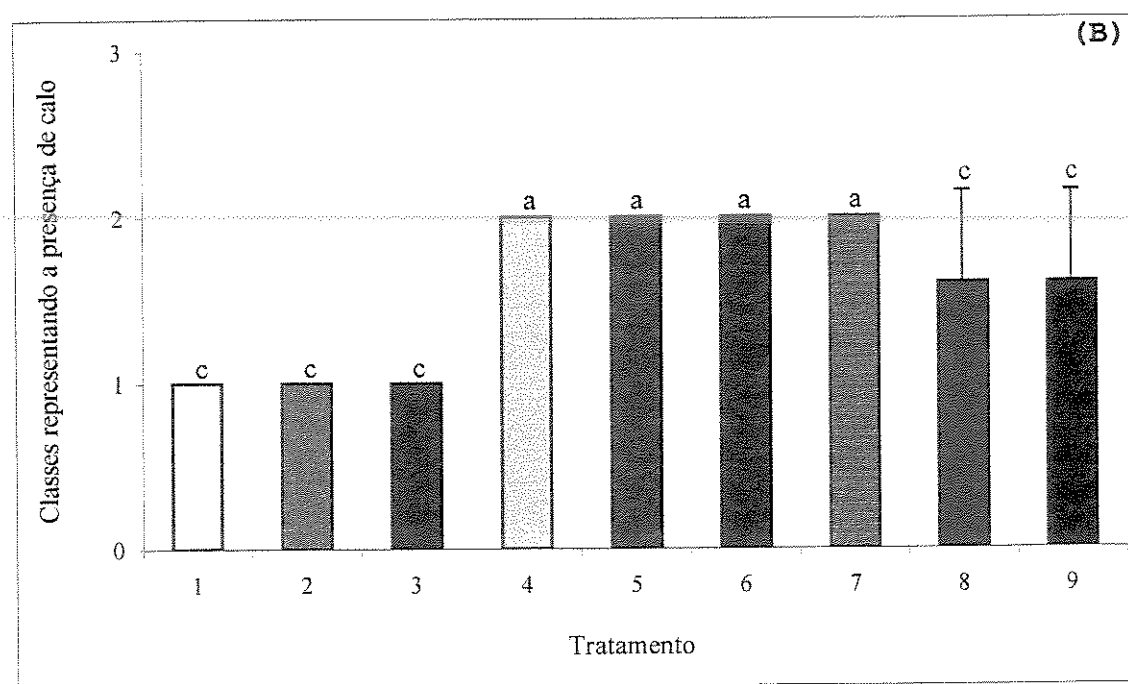
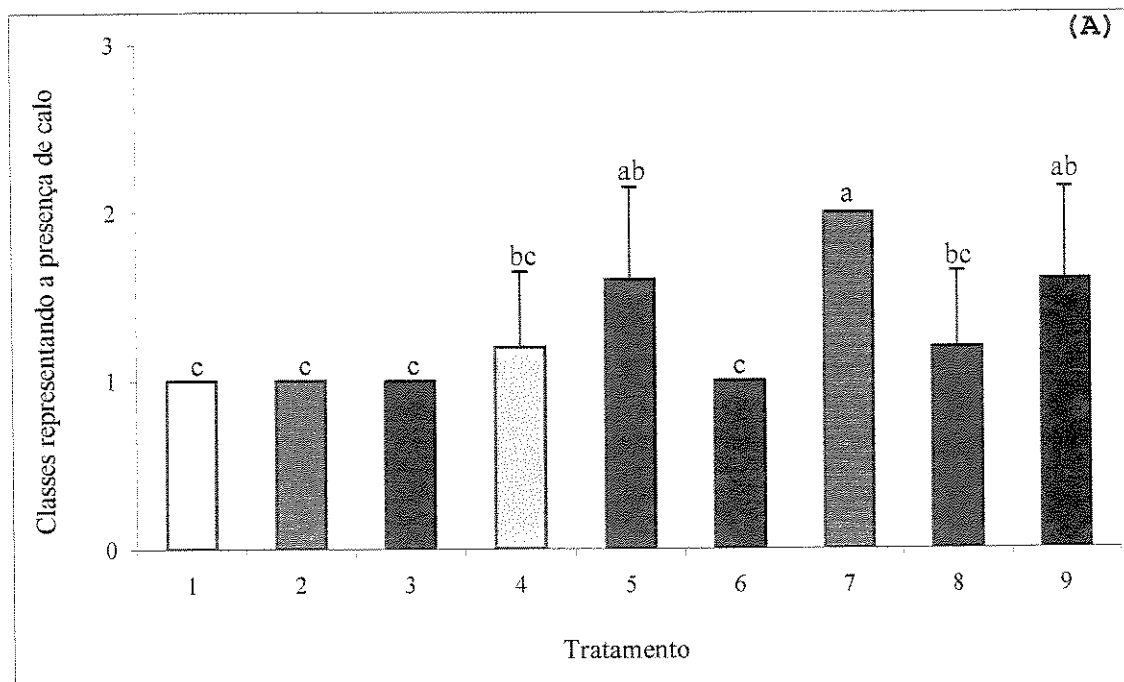


Figura 20. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,005 e 0,01 µg/ml) e de cinetina (0,01 e 0,1 µg/ml) com ANA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) sobre o parâmetro comprimento do eixo principal (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan) para os tratamentos em ambos fotoperíodos. Houve diferenças significativas, ao nível de 5%, entre a média dos resultados dos tratamentos nos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e ANA:	BA 0,005ug/ml e ANA:	BA 0,01ug/ml e ANA:	KIN 0,01ug/ml e ANA:	KIN 0,1ug/ml e ANA:
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

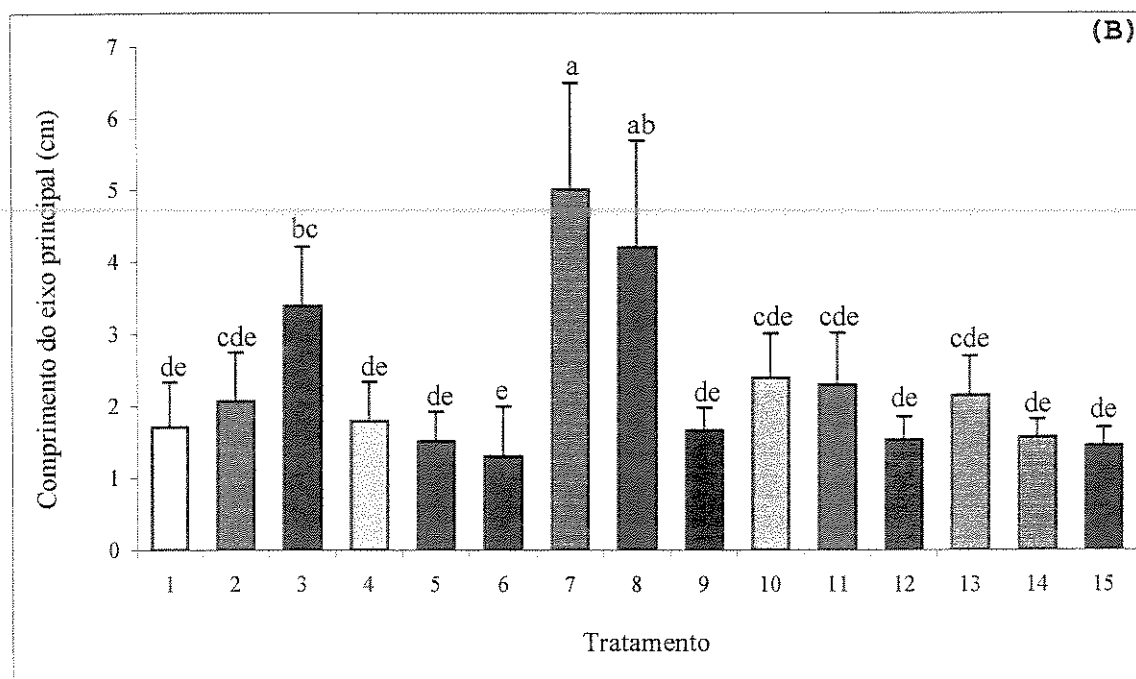
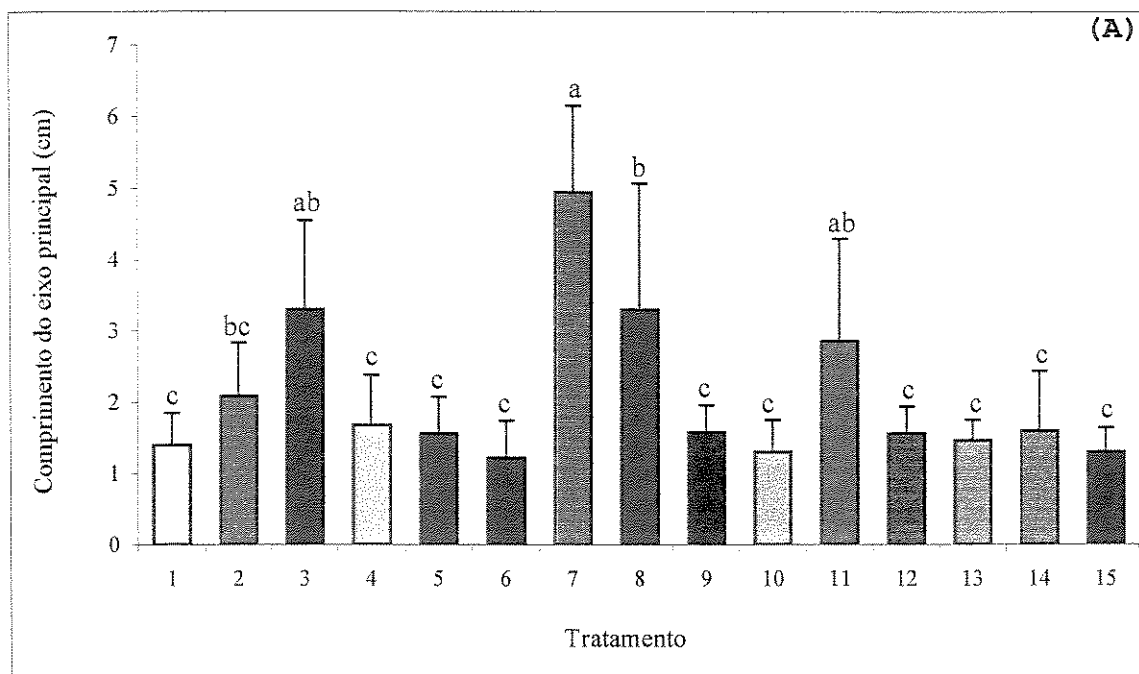


Figura 21. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,005 e 0,01 $\mu\text{g/ml}$) e de cinetina (0,01 e 0,1 $\mu\text{g/ml}$) com ANA (0,0; 0,01 e 0,1 $\mu\text{g/ml}$) sobre o parâmetro número de raízes (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro - 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=acima de 15 raízes. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 5% (teste de Duncan) para os tratamentos em fotoperíodo de 8h. Não houve diferenças significativas entre os resultados dos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e ANA:	BA 0,005ug/ml e ANA:	BA 0,01ug/ml e ANA:	KIN 0,01ug/ml ul/ml e ANA:	KIN 0,1ug/ml ul/ml e ANA:
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

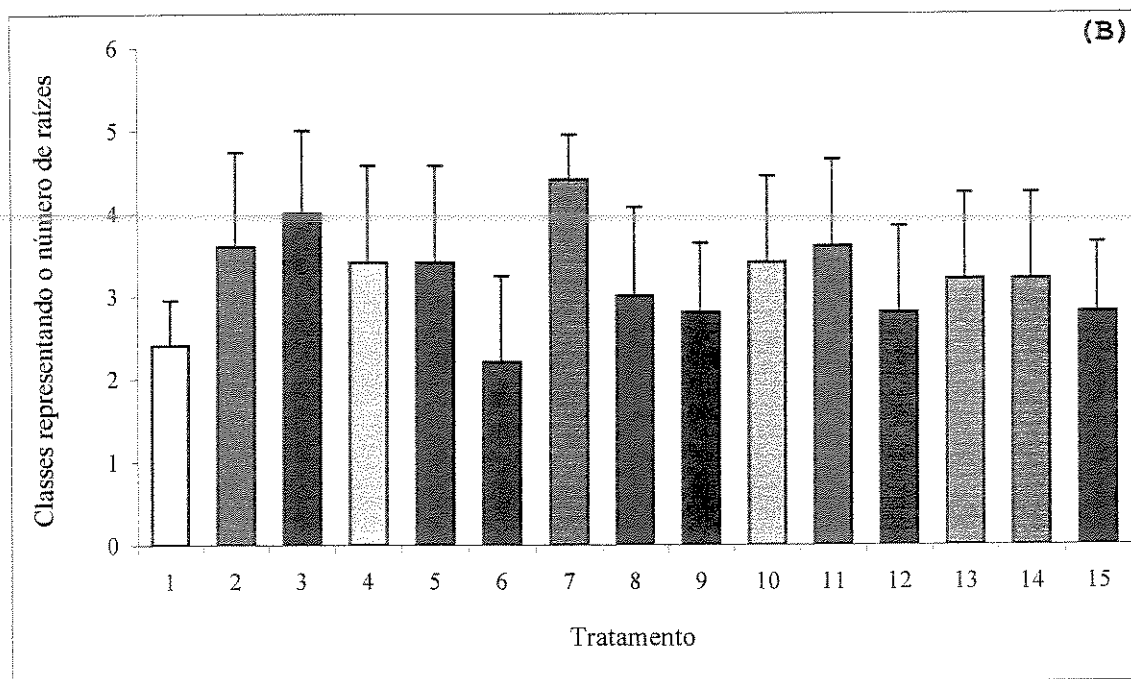
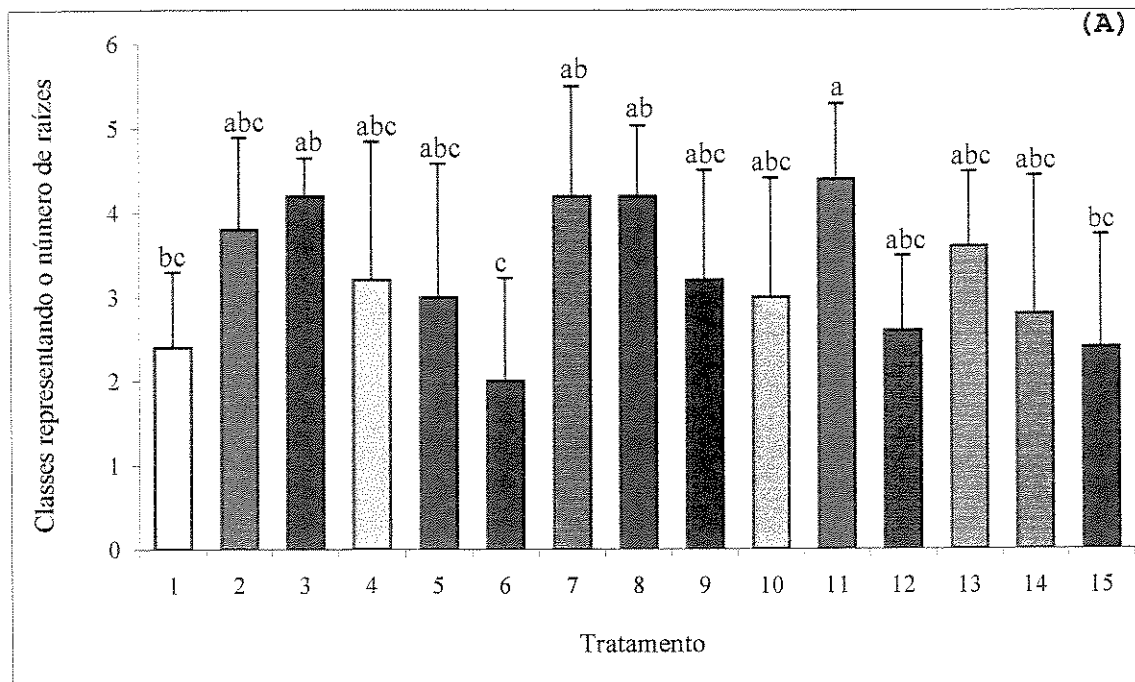


Figura 22. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,005 e 0,01 µg/ml) e de cinetina (0,01 e 0,1 µg/ml) com ANA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) sobre o parâmetro número de folhas (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro - 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=acima de 15 folhas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 5% (teste de Duncan) para os tratamentos em fotoperíodo de 8h e ao nível de 1% em 18h. Não houve diferenças significativas entre os resultados dos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e ANA:	BA 0,005ug/m e ANA:	BA 0,01ug/ml e ANA:	KIN 0,01ug/ml ul/ml e ANA:	KIN 0,1ug/ml ul/ml e ANA:
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

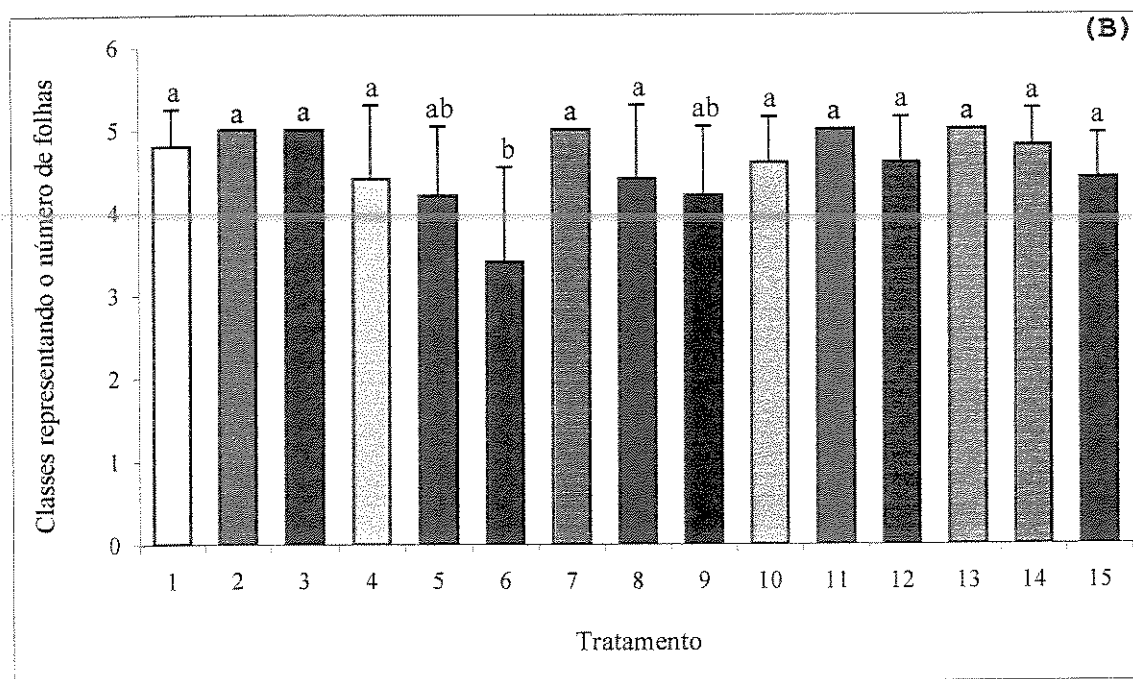
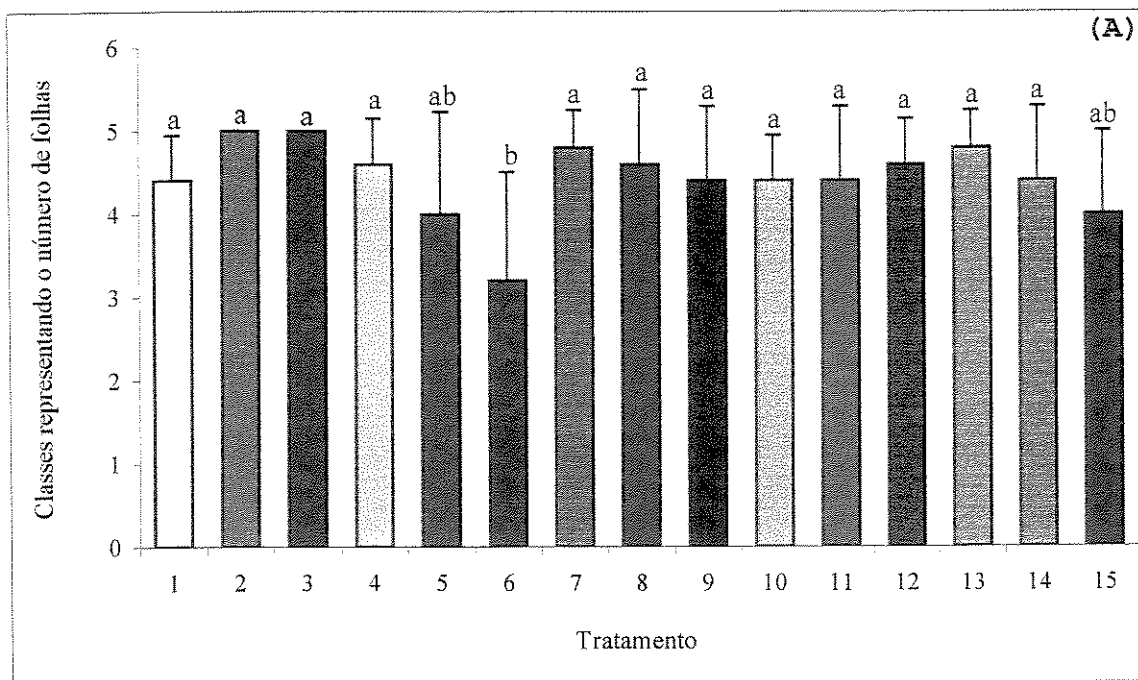
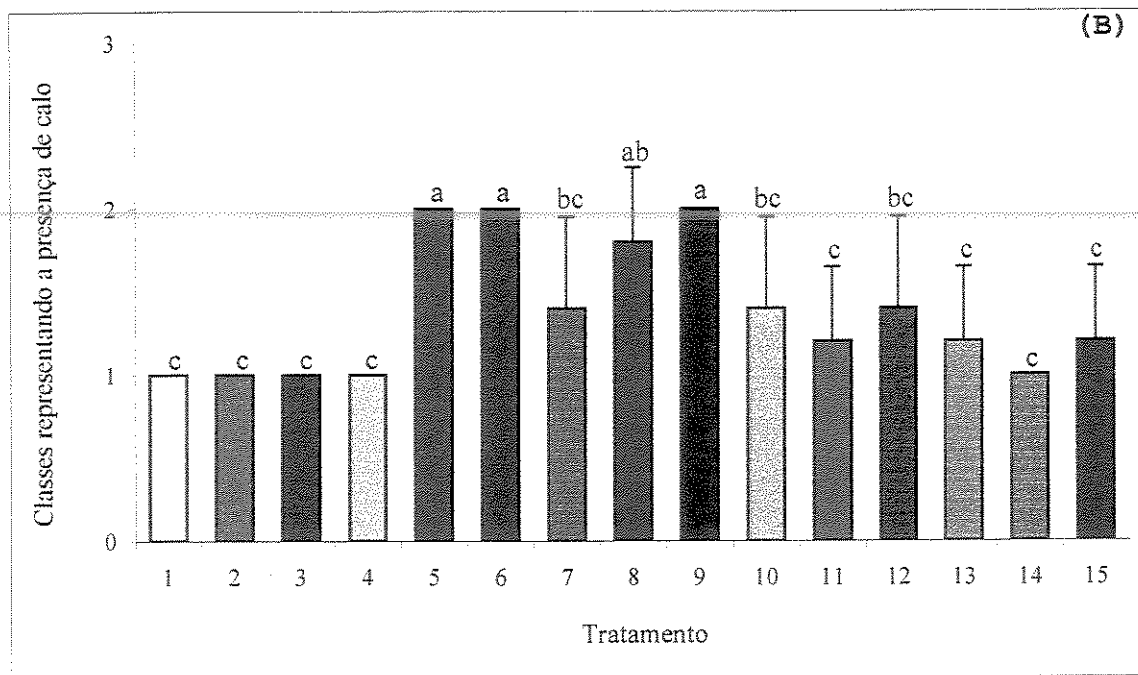
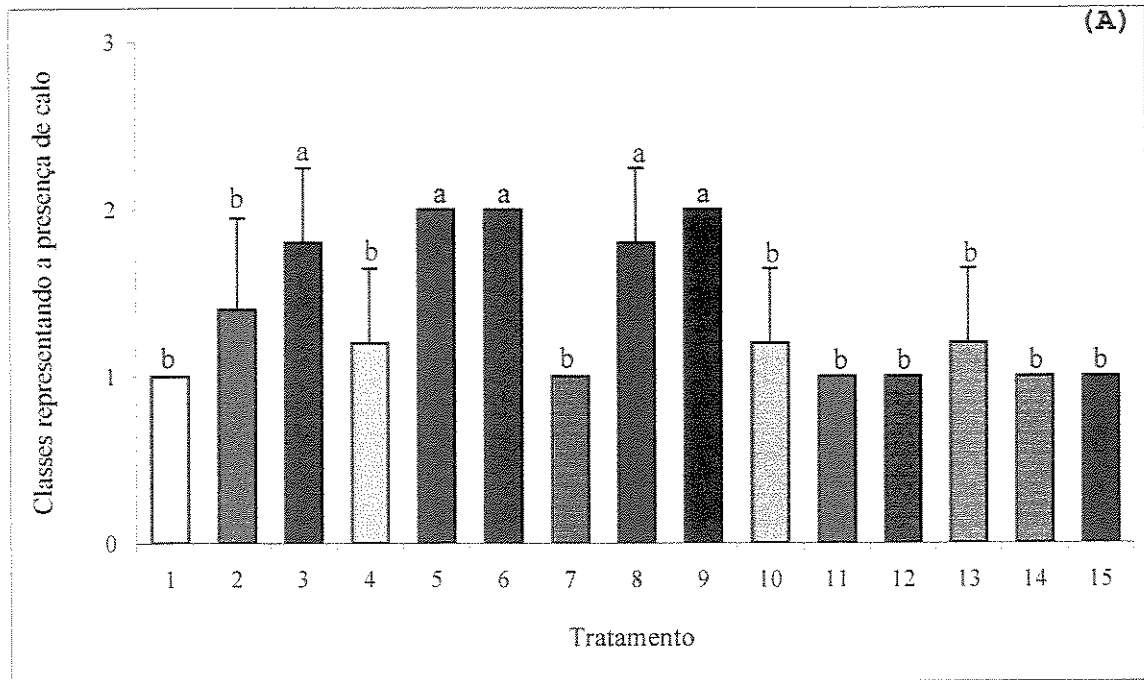


Figura 24. Explantes de *S. alagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes combinações de BA (0,0; 0,005 e 0,01 µg/ml) e de cinetina (0,01 e 0,1 µg/ml) com ANA (0,0; 0,01 e 0,1 µg/ml) sobre o parâmetro presença de calo (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro - 1= calo não presente; 2= calo presente. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan) para os tratamentos em ambos fotoperíodos. Não houve diferenças significativas entre os resultados dos fotoperíodos de 8h e 18h.

BA 0,0 ug/ml e ANA:	BA 0,005ug/ml e ANA:	BA 0,01ug/ml e ANA:	KIN 0,01ug/ml e ANA:	KIN 0,1ug/ml e ANA:
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
0,1	0,1	0,1	0,1	0,1



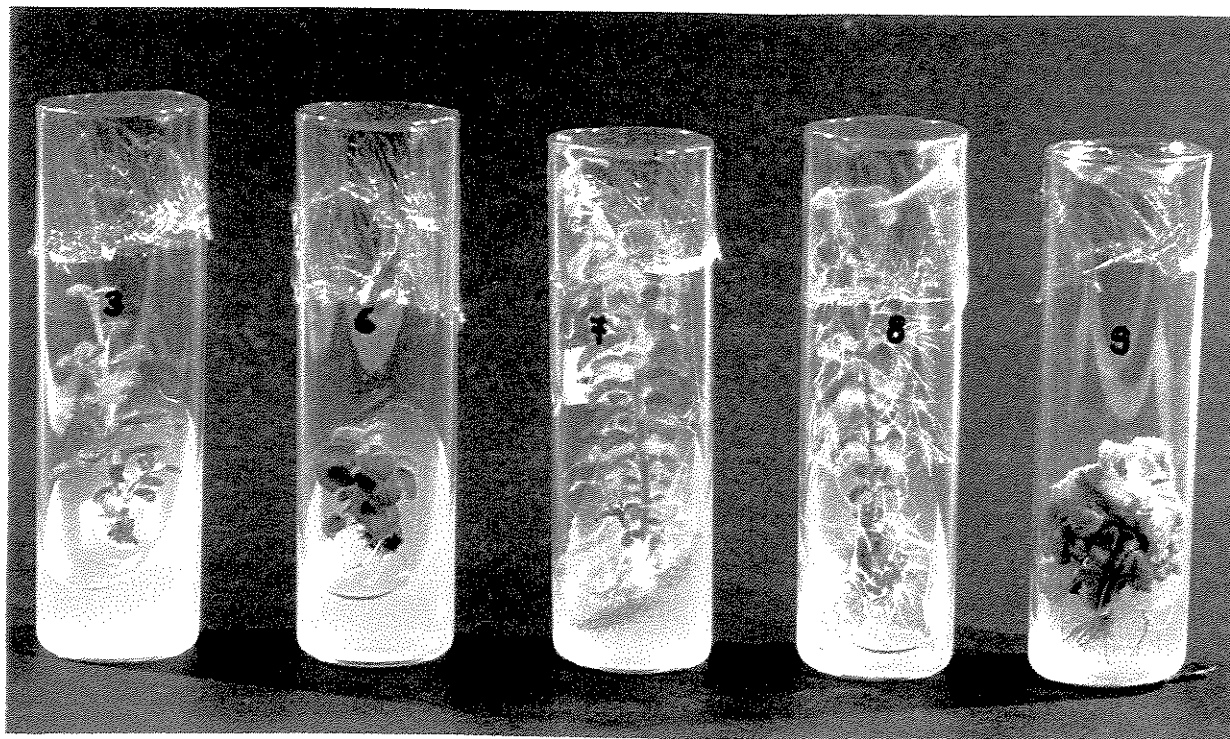


Figura 23. Efeito das diferentes combinações dos fitorreguladores BA e ANA sobre o crescimento e a morfogênese *in vitro* dos explantes de *S. allagophylla*. Tratamento: (3) ANA (0,1 $\mu\text{g/ml}$); (6) BA (0,005 $\mu\text{g/ml}$), (7) BA (0,01 $\mu\text{g/ml}$); (8) BA (0,01 $\mu\text{g/ml}$) combinado com ANA (0,01 $\mu\text{g/ml}$) e (9) BA (0,01 $\mu\text{g/ml}$) combinado com ANA (0,1 $\mu\text{g/ml}$).

5-Efeito das razões de nitrato:amônio e interações destas razões com concentrações variadas de sacarose

Os meios com os tratamentos em fotoperíodo de 8h, com a concentração de NH_4NO_3 em 100% em relação ao meio MS e a do KNO_3 em 100% e diluído 50% e 25%, induziram uma diminuição significativa, ao nível de 1%, do comprimento do eixo principal com o aumento da concentração de sacarose, independente das razões $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$. Já nos meios com KNO_3 em 100% e NH_4NO_3 em 50% e 25% o efeito da concentração de sacarose não foi significativo. Os maiores valores para este parâmetro foram observados nas proporções de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ em 100%:100% e 100%:50% acrescido de sacarose 3% (p/v), com diferença significativa ao nível 1% (tabela 7).

Nos tratamentos com fotoperíodo de 18h houve diminuição significativa do comprimento do eixo principal nos meios com sacarose 8% e 10%, sendo os valores significativamente maiores, ao nível de 0,1%, nos meios com as proporções de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ em 100%:100% e 100%:25%, acrescido de sacarose 4% (tabela 8).

Para o número e comprimento das raízes os resultados foram o contrário do encontrado para o comprimento do eixo principal, com os valores 0,1% significativamente maiores, nos meios com proporções de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ maiores e sacarose em 10%, quando em fotoperíodo de 8h (tabela 9) e de sacarose 4%, em 18h (tabela 10). O número e comprimento das raízes foram significativamente

maiores, ao nível de 5%, nos explantes crescidos em fotoperíodo de 8h.

Os valores para o número de folhas não apresentaram diferenças significativas no fotoperíodo de 8h, com todos os explantes com mais de dez folhas (tabela 11). Nos tratamentos em fotoperíodo de 18h os valores foram significativamente maiores, ao nível de 0,1%, nos tratamentos com sacarose 3% e 4% (p/v), independente das proporções de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (tabela 12).

A expansão foliar foi significativamente maior nos meios com sacarose 8% (p/v) em fotoperíodo de 8h (tabela 13) e nos meios com sacarose 3% e 4%, em 18h (tabela 14); sem o efeito de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$.

O número de brotos (tabelas 15 e 16) e a porcentagem de clorose (tabelas 17 e 18), apresentaram valores significativamente maiores nas concentrações maiores de sacarose (8% e 10% p/v), sem efeito significativo das razões de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$. A porcentagem de clorose das folhas foi significativamente maior, ao nível de 1%, nos fotoperíodos de 18h em relação ao de 8h.

Tabelas 7 e 8. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do comprimento do eixo principal (cm) dos explantes de *S. allagophylla*, após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 (fotoperíodo de 8h e 18h).

KNO ₃ :NH ₄ NO ₃ (mmoles.l ⁻¹) (8h) *						
Sacarose %	27,53 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	21,75 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	18,86 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	19,54 NO ₃ ⁻ 2,32 NH ₄ ⁺	15,54 NO ₃ ⁻ 1,16 NH ₄ ⁺	Média
3	2,8 $\pm$ 1,56 ab	2,9 $\pm$ 1,02 a	2,1 $\pm$ 0,39 abcd	2,0 $\pm$ 0,51 abcd	1,7 $\pm$ 0,61 cd	2,3 $\pm$ 0,52
4	2,4 $\pm$ 1,11 abc	1,9 $\pm$ 0,53 bcd	1,9 $\pm$ 0,22 bcd	2,2 $\pm$ 0,43 abcd	2,2 $\pm$ 0,66 abcd	2,1 $\pm$ 0,22
8	1,6 $\pm$ 0,31 cd	1,6 $\pm$ 0,15 cd	1,7 $\pm$ 0,25 cd	2,4 $\pm$ 0,16 abc	2,0 $\pm$ 0,71 abcd	1,8 $\pm$ 0,34
10	1,3 $\pm$ 0,37 d	1,5 $\pm$ 0,22 cd	1,4 $\pm$ 0,16 cd	2,2 $\pm$ 0,72 abcd	1,9 $\pm$ 0,64 bcd	1,6 $\pm$ 0,38
Média	2,0 $\pm$ 0,69	2,0 $\pm$ 0,63	1,8 $\pm$ 0,29	2,2 $\pm$ 0,16	1,9 $\pm$ 0,21	

* Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 1% (teste de Duncan).

KNO ₃ :NH ₄ NO ₃ (mmoles.l ⁻¹) (18h) *						
Sacarose %	27,53 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	21,75 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	18,86 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	19,54 NO ₃ ⁻ 2,32 NH ₄ ⁺	15,54 NO ₃ ⁻ 1,16 NH ₄ ⁺	Média *
3	1,5 $\pm$ 0,21 cde	2,2 $\pm$ 0,56 bc	2,0 $\pm$ 0,51 bcd	1,7 $\pm$ 0,55 bcde	2,3 $\pm$ 0,57 bc	1,9 $\pm$ 0,34 b
4	2,5 $\pm$ 1,03 ab	2,0 $\pm$ 0,17 bcd	3,4 $\pm$ 0,85 a	2,2 $\pm$ 0,32 bc	2,6 $\pm$ 0,61 ab	2,5 $\pm$ 0,54 a
8	1,0 $\pm$ 0,28 de	0,9 $\pm$ 0,11 e	1,0 $\pm$ 0,20 e	1,0 $\pm$ 0,30 e	1,5 $\pm$ 1,14 cde	1,1 $\pm$ 0,24 c
10	1,2 $\pm$ 0,43 de	0,9 $\pm$ 0,88 e	0,9 $\pm$ 0,18 e	1,1 $\pm$ 0,29 de	1,1 $\pm$ 0,52 de	1,0 $\pm$ 0,13 c
Média	1,5 $\pm$ 0,66	1,5 $\pm$ 0,70	1,8 $\pm$ 1,16	1,5 $\pm$ 0,56	1,9 $\pm$ 0,69	

* Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan).

Tabelas 9 e 10. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) das classes que representam intervalos de valores do número de raízes dos explantes de *S. allagophylla*, após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 (fotoperíodo de 8h e 18h).

KNO ₃ :NH ₄ NO ₃ (mmole.l ⁻¹) (8h)*						
Sacarose %	27,53 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	21,75 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	18,86 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	19,54 NO ₃ ⁻ 2,32 NH ₄ ⁺	15,54 NO ₃ ⁻ 1,16 NH ₄ ⁺	Média
3	1,4 $\pm$ 0,51 c	1,8 $\pm$ 0,45 bc	1,6 $\pm$ 0,55 c	1,8 $\pm$ 0,45 bc	1,8 $\pm$ 1,09 bc	1,7 $\pm$ 0,18
4	2,0 $\pm$ 0,00 bc	1,6 $\pm$ 0,55 c	1,6 $\pm$ 0,55 c	1,8 $\pm$ 0,45 bc	2,0 $\pm$ 1,0 bc	1,8 $\pm$ 0,20
8	1,2 $\pm$ 0,45 c	1,4 $\pm$ 0,55 c	1,2 $\pm$ 0,45 c	1,4 $\pm$ 0,55 c	1,8 $\pm$ 0,45 bc	1,4 $\pm$ 0,24
10	1,2 $\pm$ 0,45 c	1,8 $\pm$ 0,45 bc	1,4 $\pm$ 0,55 c	3,0 $\pm$ 0,00 a	2,6 $\pm$ 0,55 ab	2,0 $\pm$ 0,77
Média	1,4 $\pm$ 0,38	1,6 $\pm$ 0,19	1,4 $\pm$ 0,19	2,0 $\pm$ 0,69	2,0 $\pm$ 0,38	

* Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan).

KNO ₃ :NH ₄ NO ₃ (mmoles.l ⁻¹) (18h)*						
Sacarose %	27,53 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	21,75 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	18,86 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	19,54 NO ₃ ⁻ 2,32 NH ₄ ⁺	15,54 NO ₃ ⁻ 1,16 NH ₄ ⁺	Média ***
3	1,0 $\pm$ 0,00 c	1,4 $\pm$ 0,89 c	1,8 $\pm$ 0,45 bc	1,2 $\pm$ 0,45 c	3,2 $\pm$ 1,04 a	1,7 $\pm$ 0,87 ab
4	1,6 $\pm$ 0,89 c	1,0 $\pm$ 0,00 c	1,8 $\pm$ 0,45 bc	2,8 $\pm$ 0,64 ab	3,0 $\pm$ 0,87 a	2,0 $\pm$ 0,84 a
8	1,0 $\pm$ 0,00 c	1,0 $\pm$ 0,00 c	1,0 $\pm$ 0,00 c	1,0 $\pm$ 0,00 c	1,4 $\pm$ 0,89 c	1,1 $\pm$ 0,18 b
10	1,0 $\pm$ 0,00 c	1,0 $\pm$ 0,00 c	1,0 $\pm$ 0,00 c	1,0 $\pm$ 0,00 c	2,2 $\pm$ 1,04 abc	1,2 $\pm$ 0,54 b
Média **	1,1 $\pm$ 0,30 b	1,1 $\pm$ 0,20 b	1,4 $\pm$ 0,46 b	1,3 $\pm$ 0,51 b	2,4 $\pm$ 0,82 a	

Letras diferentes indicam diferenças significativas: *ao nível de 0,1% (teste de Duncan), **ao nível de 1% e ***ao nível de 5%.

Classes - 1=0; 2=1-5; 3=5-10; 4=10-15; 5=mais de 15 raízes.

Tabelas 11 e 12. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) das classes que representam intervalos de valores do número de folhas dos explantes de *S. allagophylla*, após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 (fotoperíodo de 8h e 18h).

KNO ₃ :NH ₄ NO ₃ (mmoles.l ⁻¹) (8h)						
Sacarose %	27,53 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	21,75 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	18,86 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	19,54 NO ₃ ⁻ 2,32 NH ₄ ⁺	15,54 NO ₃ ⁻ 1,16 NH ₄ ⁺	Média
3	4,8 $\pm$ 0,45	4,8 $\pm$ 0,45	4,2 $\pm$ 0,84 bc	4,4 $\pm$ 0,55	4,6 $\pm$ 0,55	4,6 $\pm$ 0,26
4	4,4 $\pm$ 0,55	4,4 $\pm$ 0,55	3,8 $\pm$ 0,84	4,6 $\pm$ 0,55	4,4 $\pm$ 0,89	4,3 $\pm$ 0,30
8	4,8 $\pm$ 0,45	4,4 $\pm$ 0,89	4,8 $\pm$ 0,45	5,0 $\pm$ 0,00	4,6 $\pm$ 0,89	4,7 $\pm$ 0,23
10	4,0 $\pm$ 1,00	4,2 $\pm$ 1,09	4,2 $\pm$ 0,86	5,0 $\pm$ 0,00	4,8 $\pm$ 0,45	4,4 $\pm$ 0,43
Média	4,5 $\pm$ 0,38	4,4 $\pm$ 0,25	4,2 $\pm$ 0,41	4,7 $\pm$ 0,30	4,6 $\pm$ 0,16	
Diferenças não foram significativas entre os tratamentos.						

KNO ₃ :NH ₄ NO ₃ (mmoles.l ⁻¹) (18h) *						
Sacarose %	27,53 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	21,75 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	18,86 NO ₃ ⁻ 4,64 NH ₄ ⁺	19,54 NO ₃ ⁻ 2,32 NH ₄ ⁺	15,54 NO ₃ ⁻ 1,16 NH ₄ ⁺	Média *
3	4,8 $\pm$ 0,45 a	5,0 $\pm$ 0,00 a	5,0 $\pm$ 0,00 a	4,8 $\pm$ 0,45 a	5,0 $\pm$ 0,00 a	4,9 $\pm$ 0,11 a
4	4,8 $\pm$ 0,45 a	4,4 $\pm$ 0,55 abc	5,0 $\pm$ 0,00 a	5,0 $\pm$ 0,00 a	4,8 $\pm$ 0,45 a	4,8 $\pm$ 0,24 a
8	3,8 $\pm$ 1,09 bcd	3,8 $\pm$ 0,84 bcd	3,8 $\pm$ 0,84 bcd	4,2 $\pm$ 0,45 abc	4,6 $\pm$ 0,55 ab	4,0 $\pm$ 0,36 b
10	2,8 $\pm$ 0,84 e	3,6 $\pm$ 0,55 cde	3,2 $\pm$ 0,45 de	3,6 $\pm$ 0,89 cde	4,2 $\pm$ 0,84 abc	3,5 $\pm$ 0,52 c
Média	4,0 $\pm$ 0,96	4,2 $\pm$ 0,63	4,2 $\pm$ 0,90	4,4 $\pm$ 0,63	4,6 $\pm$ 0,34	

* Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan).

Classes - 1=0; 2=1-5; 3=5-10; 4=10-15; 5=mais de 15 folhas.

Tabelas 13 e 14. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) das classes que representam intervalos de valores da expansão foliar dos explantes de *S. allagophylla*, após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 (fotoperíodo de 8h e 18h).

$\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{NO}_3$ (mmoles.l ⁻¹) (8h) *						
Sacarose %	27,53 NO_3^- 4,64 NH_4^+	21,75 NO_3^- 4,64 NH_4^+	18,86 NO_3^- 4,64 NH_4^+	19,54 NO_3^- 2,32 NH_4^+	15,54 NO_3^- 1,16 NH_4^+	Média
3	1,6 $\pm$ 0,55 bc	2,0 $\pm$ 0,00 ab	1,0 $\pm$ 0,00 c	1,6 $\pm$ 0,55 bc	1,4 $\pm$ 0,55 bc	1,5 $\pm$ 0,36
4	1,4 $\pm$ 0,55 bc	1,0 $\pm$ 0,00 c	1,4 $\pm$ 0,89 bc	1,6 $\pm$ 0,55 bc	2,0 $\pm$ 1,0 ab	1,5 $\pm$ 0,36
8	1,8 $\pm$ 0,84 abc	1,4 $\pm$ 0,55 bc	2,0 $\pm$ 1,00 ab	2,6 $\pm$ 0,55 a	1,6 $\pm$ 0,89 bc	1,9 $\pm$ 0,46
10	1,2 $\pm$ 0,45 bc	1,2 $\pm$ 0,45 bc	1,0 $\pm$ 0,00 c	1,8 $\pm$ 0,45 abc	1,4 $\pm$ 0,89 bc	1,3 $\pm$ 0,30
Média	1,5 $\pm$ 0,26	1,4 $\pm$ 0,43	1,3 $\pm$ 0,47	1,9 $\pm$ 0,48	1,6 $\pm$ 0,28	

* Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 5% (teste de Duncan).

$\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{NO}_3$ (mmoles.l ⁻¹) (18h) *						
Sacarose %	27,53 NO_3^- 4,64 NH_4^+	21,75 NO_3^- 4,64 NH_4^+	18,86 NO_3^- 4,64 NH_4^+	19,54 NO_3^- 2,32 NH_4^+	15,54 NO_3^- 1,16 NH_4^+	Média **
3	1,0 $\pm$ 0,00 d	1,8 $\pm$ 0,45 abc	1,4 $\pm$ 0,55 cd	1,6 $\pm$ 0,55 bcd	2,2 $\pm$ 0,84 ab	1,6 $\pm$ 0,45 b
4	1,4 $\pm$ 0,55 cd	1,2 $\pm$ 0,45 cd	2,4 $\pm$ 0,55 a	2,2 $\pm$ 0,45 ab	2,2 $\pm$ 0,84 ab	1,9 $\pm$ 0,54 a
8	1,0 $\pm$ 0,00 d	1,0 $\pm$ 0,00 d	1,0 $\pm$ 0,00 d	1,0 $\pm$ 0,00 d	1,2 $\pm$ 0,45 cd	1,0 $\pm$ 0,89 c
10	1,2 $\pm$ 0,45 cd	1,0 $\pm$ 0,00 d	1,2 $\pm$ 0,45 cd	1,0 $\pm$ 0,00 d	1,2 $\pm$ 0,45 cd	1,1 $\pm$ 0,11 c
Média	1,1 $\pm$ 0,19	1,2 $\pm$ 0,38	1,5 $\pm$ 0,62	1,4 $\pm$ 0,57	1,7 $\pm$ 0,57	

Letras diferentes indicam diferenças significativas: *ao nível de 0,1% (teste de Duncan); **ao nível de 1%.

Tabelas 15 e 16. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) das classes que representam intervalos do número de brotos dos explantes de *S. allagophylla*, após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 (fotoperíodo de 8h e 18h).

$\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{NO}_3$ (mmoles.l ⁻¹) (8h) *						
Sacarose %	27,53 NO_3^- 4,64 NH_4^+	21,75 NO_3^- 4,64 NH_4^+	18,86 NO_3^- 4,64 NH_4^+	19,54 NO_3^- 2,32 NH_4^+	15,54 NO_3^- 1,16 NH_4^+	Média *
3	1,4 $\pm$ 0,55 c	2,8 $\pm$ 1,04 abc	1,6 $\pm$ 0,55 c	1,4 $\pm$ 0,55 c	2,2 $\pm$ 1,05 bc	1,9 $\pm$ 0,61 b
4	1,6 $\pm$ 0,55 c	1,6 $\pm$ 0,55 c	1,6 $\pm$ 1,04 c	1,6 $\pm$ 0,55 c	1,6 $\pm$ 0,55 c	1,6 $\pm$ 0,03 b
8	2,8 $\pm$ 0,84 abc	2,8 $\pm$ 1,05 abc	3,2 $\pm$ 1,09 ab	3,6 $\pm$ 0,89 a	2,2 $\pm$ 1,05 bc	2,9 $\pm$ 0,52 a
10	1,8 $\pm$ 0,84 c	2,8 $\pm$ 1,04 abc	2,2 $\pm$ 0,84 bc	2,0 $\pm$ 0,71 bc	2,4 $\pm$ 0,89 abc	2,2 $\pm$ 0,38 b
Média	1,9 $\pm$ 0,62	2,5 $\pm$ 0,60	2,1 $\pm$ 0,75	2,1 $\pm$ 0,99	2,1 $\pm$ 0,35	

* Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 1% (teste de Duncan).

$\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{NO}_3$ (mmoles.l ⁻¹) (18h)						
Sacarose %	27,53 NO_3^- 4,64 NH_4^+	21,75 NO_3^- 4,64 NH_4^+	18,86 NO_3^- 4,64 NH_4^+	19,54 NO_3^- 2,32 NH_4^+	15,54 NO_3^- 1,16 NH_4^+	Média
3	1,6 $\pm$ 0,55	2,2 $\pm$ 1,04	1,6 $\pm$ 0,55	1,8 $\pm$ 0,45	2,2 $\pm$ 0,45	1,9 $\pm$ 0,30
4	2,0 $\pm$ 0,71	1,4 $\pm$ 0,55	2,8 $\pm$ 1,04	1,6 $\pm$ 0,55	1,8 $\pm$ 0,84	1,9 $\pm$ 0,54
8	1,8 $\pm$ 1,09	1,6 $\pm$ 0,89	1,8 $\pm$ 1,04	2,0 $\pm$ 0,00	2,0 $\pm$ 0,71	1,8 $\pm$ 0,17
10	1,2 $\pm$ 0,45	1,4 $\pm$ 0,55	1,0 $\pm$ 0,00	1,2 $\pm$ 0,45	2,0 $\pm$ 0,71	1,4 $\pm$ 0,38
Média	1,6 $\pm$ 0,34	1,6 $\pm$ 0,38	1,8 $\pm$ 0,74	1,6 $\pm$ 0,34	2,0 $\pm$ 0,16	

Diferenças não foram significativas entre os tratamentos.

Classes - 1=0; 2=1-5; 3=5-10; 4=10-15; 5=mais de 15 folhas.

Tabelas 17 e 18. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) das classes que representam intervalos da porcentagem de clorose das dos explantes de *S. allagophylla*, após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 (fotoperíodo de 8h e 18h).

$\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{NO}_3$ (mmoles.l ⁻¹) (8h) *						
Sacarose %	27,53 NO_3^- 4,64 NH_4^+	21,75 NO_3^- 4,64 NH_4^+	18,86 NO_3^- 4,64 NH_4^+	19,54 NO_3^- 2,32 NH_4^+	15,54 NO_3^- 1,16 NH_4^+	Média **
3	1,0 $\pm$ 0,00 b	1,0 $\pm$ 0,00 b	1,0 $\pm$ 0,00 b	1,0 $\pm$ 0,00 b	1,0 $\pm$ 0,00 b	1,0 $\pm$ 0,00 b
4	1,0 $\pm$ 0,00 b	1,0 $\pm$ 0,00 b	1,2 $\pm$ 0,45 b	1,0 $\pm$ 0,00 b	1,0 $\pm$ 0,00 b	1,0 $\pm$ 0,09 b
8	1,8 $\pm$ 0,84 b	1,8 $\pm$ 1,09 b	1,8 $\pm$ 0,84 b	3,4 $\pm$ 1,34 a	1,4 $\pm$ 0,89 b	2,0 $\pm$ 0,78 a
10	1,4 $\pm$ 0,89 b	1,6 $\pm$ 0,89 b	2,0 $\pm$ 1,00 b	1,4 $\pm$ 0,55 b	1,4 $\pm$ 0,89 b	1,6 $\pm$ 0,26 ab
Média	1,3 $\pm$ 0,38	1,3 $\pm$ 0,41	1,5 $\pm$ 0,48	1,7 $\pm$ 1,15	1,2 $\pm$ 0,23	

Letras diferentes indicam diferenças significativas: *ao nível de 0,1% (teste de Duncan); **ao nível de 1%.

$\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{NO}_3$ (mmoles.l ⁻¹) (18h) *						
Sacarose %	27,53 NO_3^- 4,64 NH_4^+	21,75 NO_3^- 4,64 NH_4^+	18,86 NO_3^- 4,64 NH_4^+	19,54 NO_3^- 2,32 NH_4^+	15,54 NO_3^- 1,16 NH_4^+	Média *
3	1,0 $\pm$ 0,00 d	1,2 $\pm$ 0,45 d	1,0 $\pm$ 0,00 d	1,8 $\pm$ 0,83 cd	1,2 $\pm$ 0,45 d	1,2 $\pm$ 0,33 c
4	1,2 $\pm$ 0,45 d	1,0 $\pm$ 0,00 d	1,0 $\pm$ 0,00 d	1,6 $\pm$ 0,89 cd	1,6 $\pm$ 0,89 cd	1,3 $\pm$ 0,30 c
8	1,2 $\pm$ 0,45 d	2,2 $\pm$ 1,09 bcd	2,8 $\pm$ 1,08 bc	5,2 $\pm$ 0,45 a	2,6 $\pm$ 1,04 bcd	2,8 $\pm$ 1,47 b
10	4,6 $\pm$ 1,07 a	3,8 $\pm$ 1,04 ab	5,0 $\pm$ 1,00 a	4,8 $\pm$ 1,08 a	2,6 $\pm$ 1,08 bcd	4,1 $\pm$ 0,98 a
Média	2,0 $\pm$ 1,74	2,0 $\pm$ 1,27	2,4 $\pm$ 1,90	3,3 $\pm$ 1,90	2,0 $\pm$ 0,71	

• Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 1% (teste de Duncan). Diferenças significativas ao nível de 1% entre os tratamentos no fotoperíodo de 8h e 18h.

Classes - 1=0%; 2=5-10%; 3=10-20%; 4=20-50%; 5=50-70% e 6=70-100%.

6-Efeito das diluições do meio B5 e das interações destas diluições com concentrações variadas de sacarose

Os meios com ausência total de nutrientes e com apenas sacarose induziram valores significativamente menores para os parâmetros analisados e maiores para a porcentagem de clorose. Entretanto, mesmo após noventa dias de cultivo, não ocorreu a morte dos explantes.

Os resultados obtidos nos demais tratamentos não foram diferentes, com valores altos para os parâmetros relacionados com o crescimento radicular e da parte aérea nos explantes; sem a ocorrência de clorose, de brotos e de calo. Observou-se uma tendência de valores mais altos para tais parâmetros tanto nos meios sem diluição da composição mineral, acrescidos de sacarose 3% (p/v), como nos meios com a composição mineral diluída e acrescidos de maiores concentrações de sacarose (4% e 6% p/v) (figuras 25, 27, e 28). Em tais meios também ocorreu um número significativamente maior de raízes secundárias nos explantes, parâmetro este não observado nos outros experimentos realizados com a espécie (figura 26 e 29).

Não houve diferenças significativas no número de raízes entre os tratamentos em meio B5 (com a composição mineral total ou diluída), todos com valores altos deste parâmetro mais de dez raízes).

Figura 25. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes concentrações do meio B5 (100%, 50% e 25% da composição dos nutrientes) sobre o parâmetro comprimento do eixo principal (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan) para os tratamentos em ambos fotoperíodos. Houve diferenças significativas, ao nível de 1%, entre a média dos resultados dos tratamentos nos fotoperíodos de 8h e 18h.

B5 100% e	B5 50% e	B5 25% e	B5 0% e
sacarose:	sacarose:	sacarose:	sacarose:
□ 3%	□ 3%	□ 3%	□ 3%
■ 4%	■ 4%	■ 4%	■ 4%
■ 6%	■ 6%	■ 6%	■ 6%

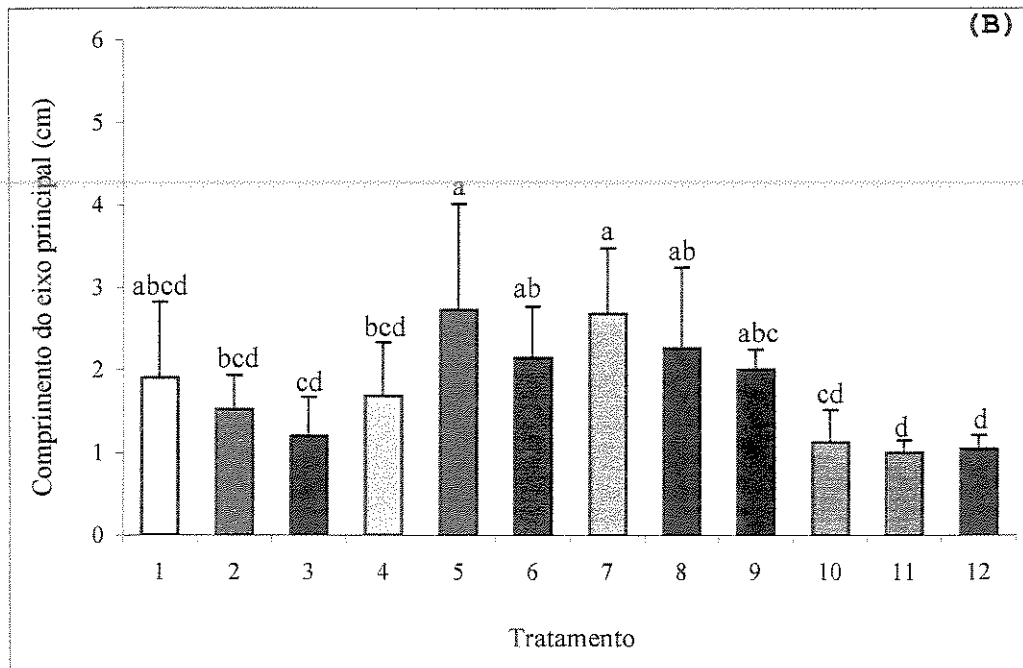
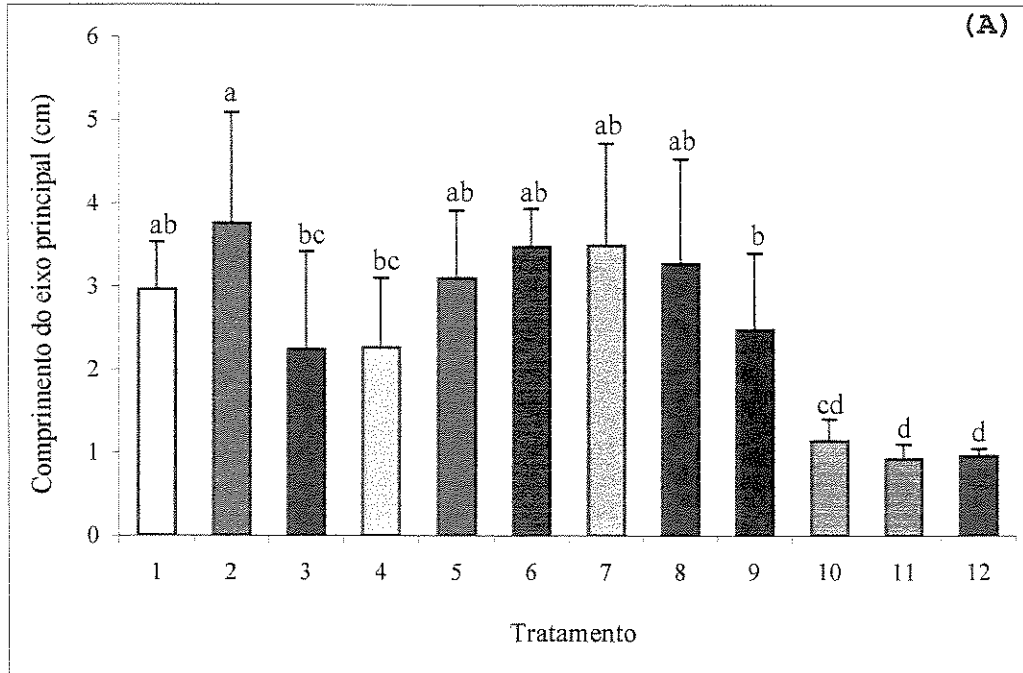


Figura 26. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes concentrações do meio B5 (100%, 50% e 25% da composição dos nutrientes) sobre o parâmetro número de raízes (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro - 1=0; 2=1 a 5; 3=5 a 10; 4=10 a 15; 5=acima de 15 raízes. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan) para os tratamentos em ambos fotoperíodos. Houve diferenças significativas, ao nível de 1%, entre as medias dos resultados dos tratamentos nos fotoperíodos de 8h e 18h.

B5 100% e	B5 50% e	B5 25% e	B% 0% e
sacarose:	sacarose:	sacarose:	sacarose:
□ 3%	□ 3%	□ 3%	□ 3%
■ 4%	■ 4%	■ 4%	■ 4%
■ 6%	■ 6%	■ 6%	■ 6%

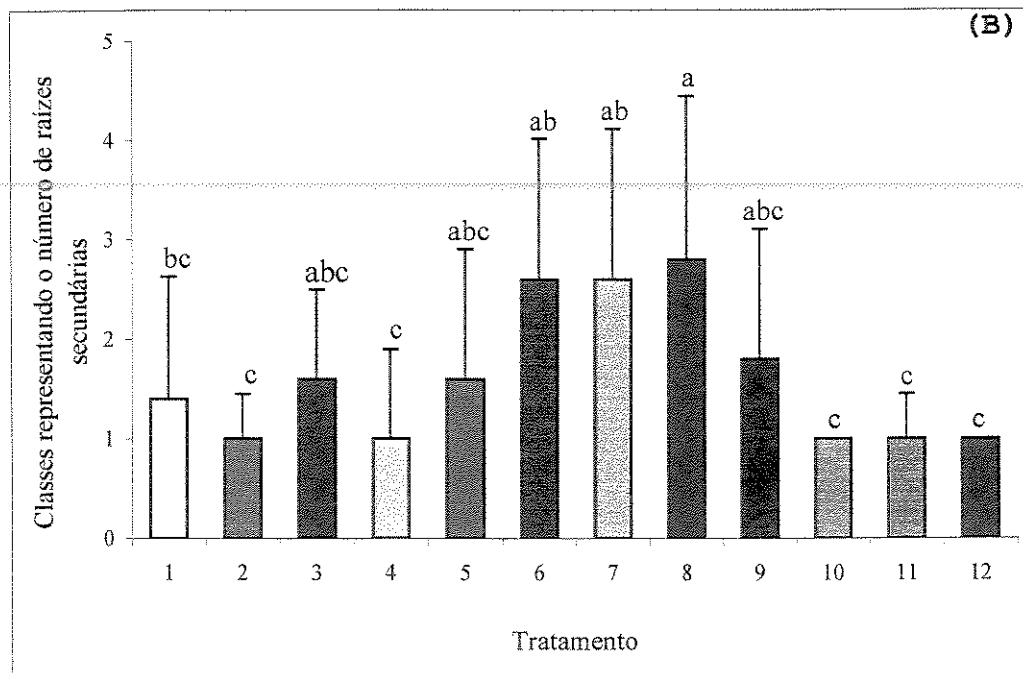
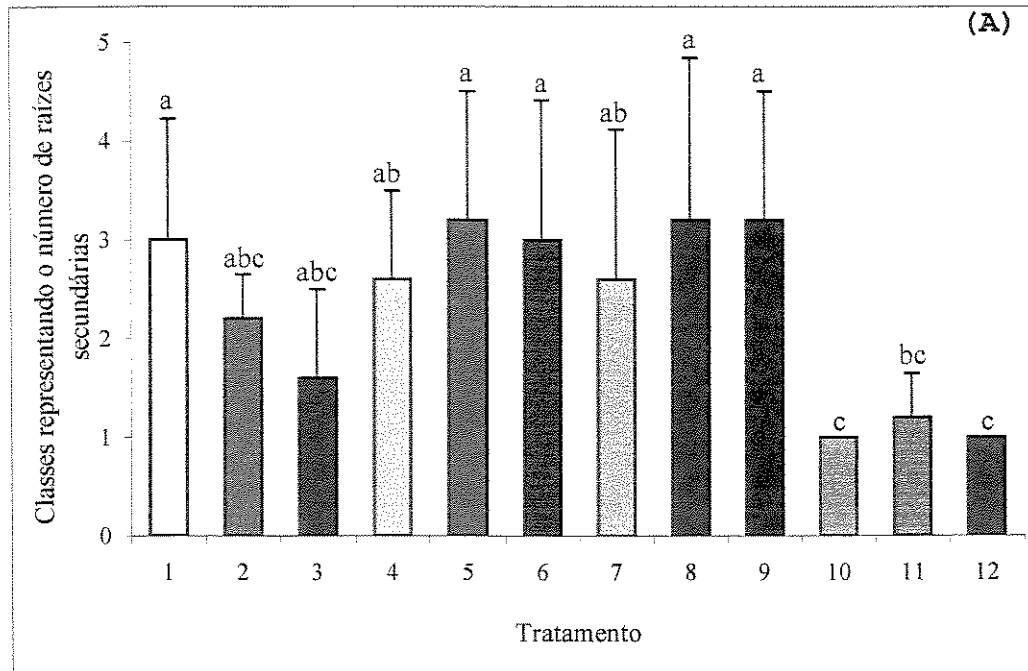


Figura 27. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes concentrações do meio B5 (100%, 50% e 25% da composição dos nutrientes) sobre o parâmetro comprimento das raízes (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro - 1=0; 2=0,1 a 1,0cm; 3=1,0 a 2,0cm; 4=2,0 a 3,0cm; 5=3,0 a 4,0cm. Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 1% (teste de Duncan) para os tratamentos em fotoperíodo de 8h e ao nível de 0,1% em 18h. Houve diferenças significativas, ao nível de 1%, entre a média dos resultados dos tratamentos nos fotoperíodos de 8h e 18h.

B5 100% e	B5 50% e	B5 25% e	B5 0% e
sacarose:	sacarose:	sacarose:	sacarose:
 3%	 3%	 3%	 3%
 4%	 4%	 4%	 4%
 6%	 6%	 6%	 6%

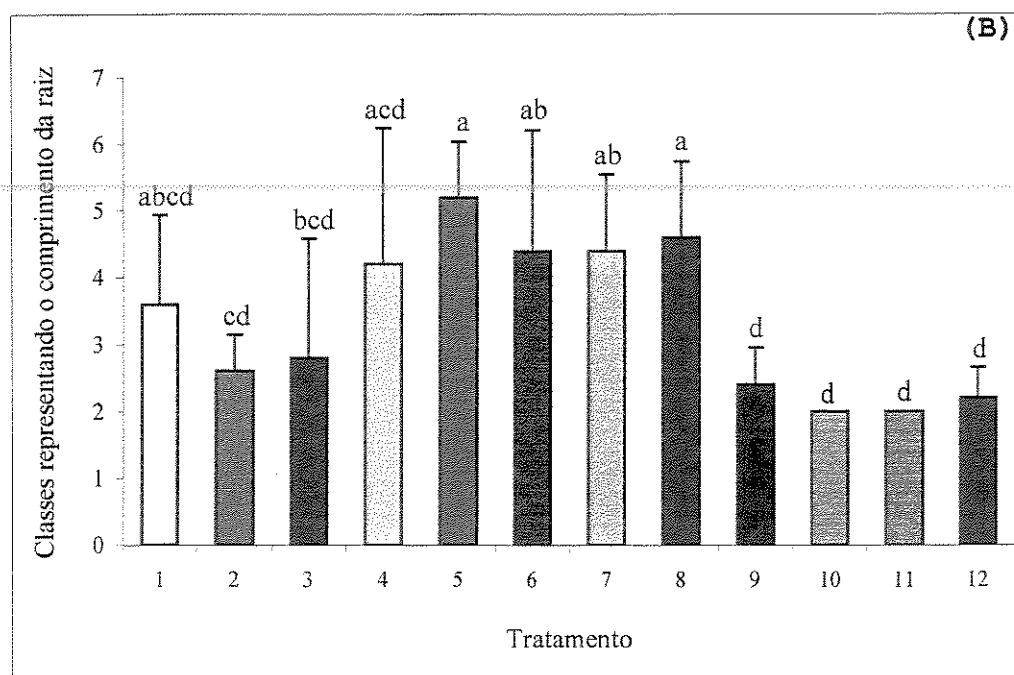
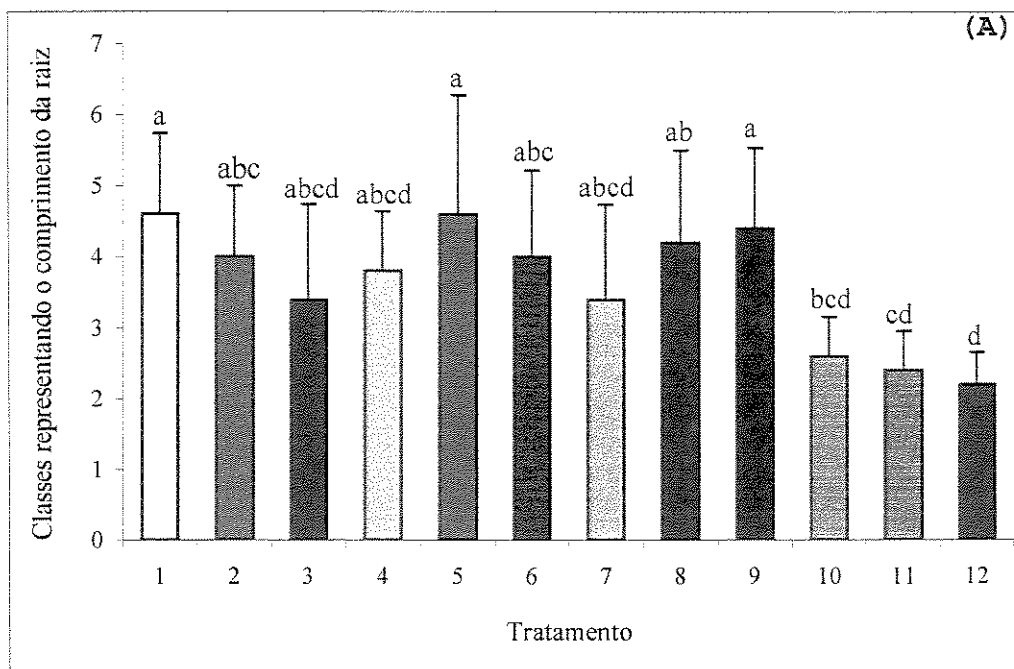
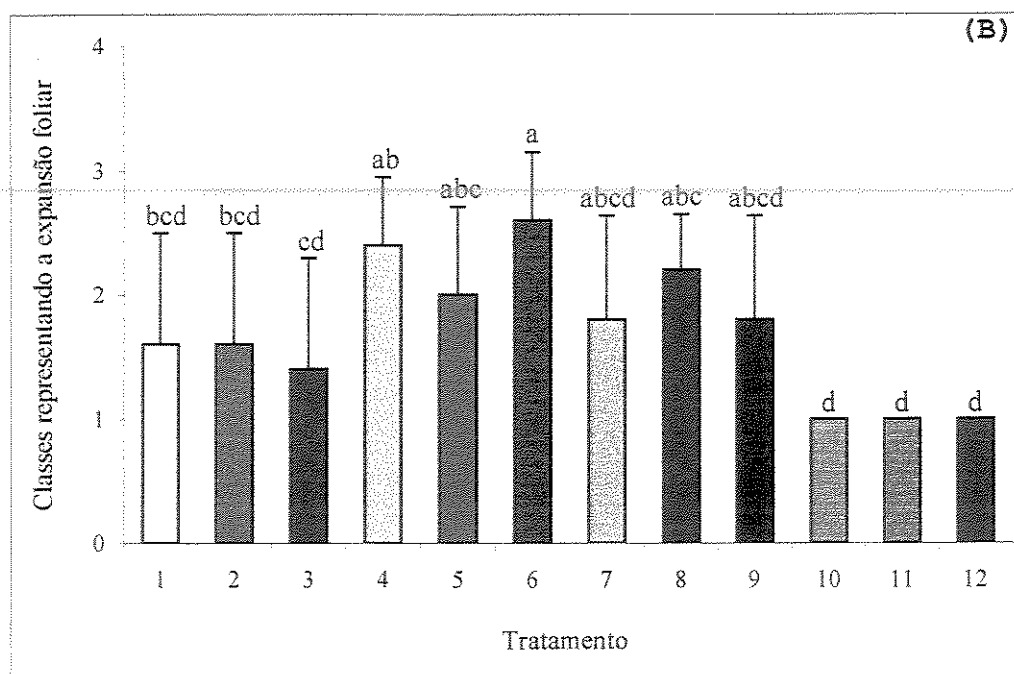
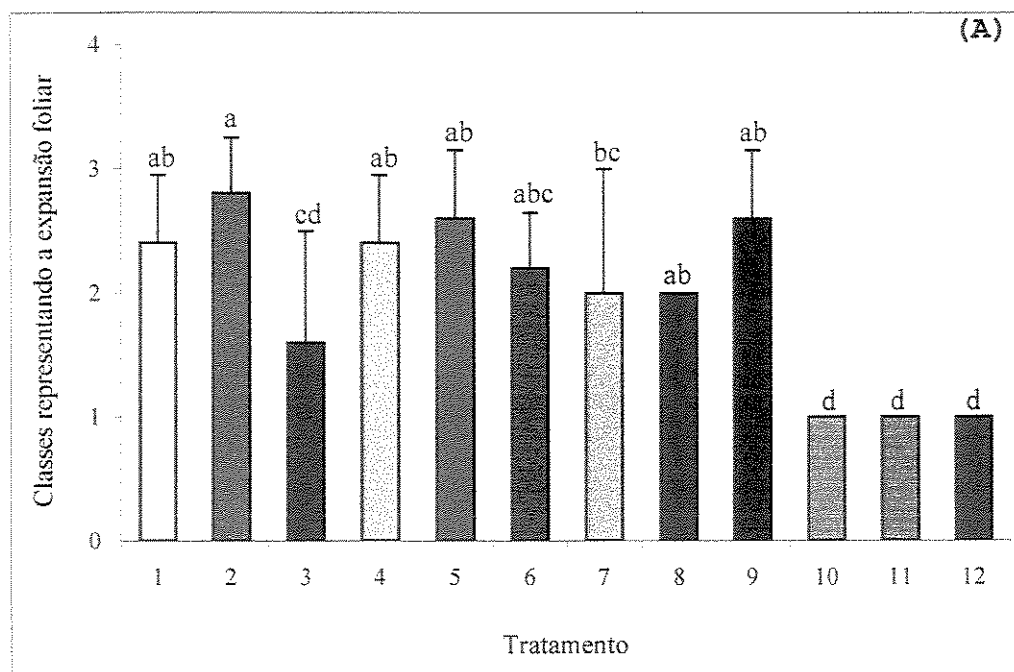


Figura 28. Explantes de *S. allagophylla* cultivados *in vitro*: efeito das diferentes concentrações do meio B5 (100%, 50% e 25% da composição dos nutrientes) sobre o parâmetro expansão foliar (médias e respectivos desvios padrões), após 90 dias de cultivo em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodos de 8h (A) e 18h (B). Classes dos valores do parâmetro -1=pouca expansão (área de $9-38 \text{ mm}^2$); 2=média expansão ($38-66 \text{ mm}^2$) e 3=grande expansão ($66-94 \text{ mm}^2$). Letras diferentes indicam diferenças significativas ao nível de 0,1% (teste de Duncan) para os tratamentos em fotoperíodo de 8h e ao nível de 1% em 18h. Não houve diferenças significativas entre a média dos resultados dos tratamentos nos fotoperíodos de 8h e 18h.

B5 100% e	B5 50% e	B5 25% e	B5 0% e
sacarose:	sacarose:	sacarose:	sacarose:
□ 3%	□ 3%	□ 3%	□ 3%
■ 4%	■ 4%	■ 4%	■ 4%
■ 6%	■ 6%	■ 6%	■ 6%



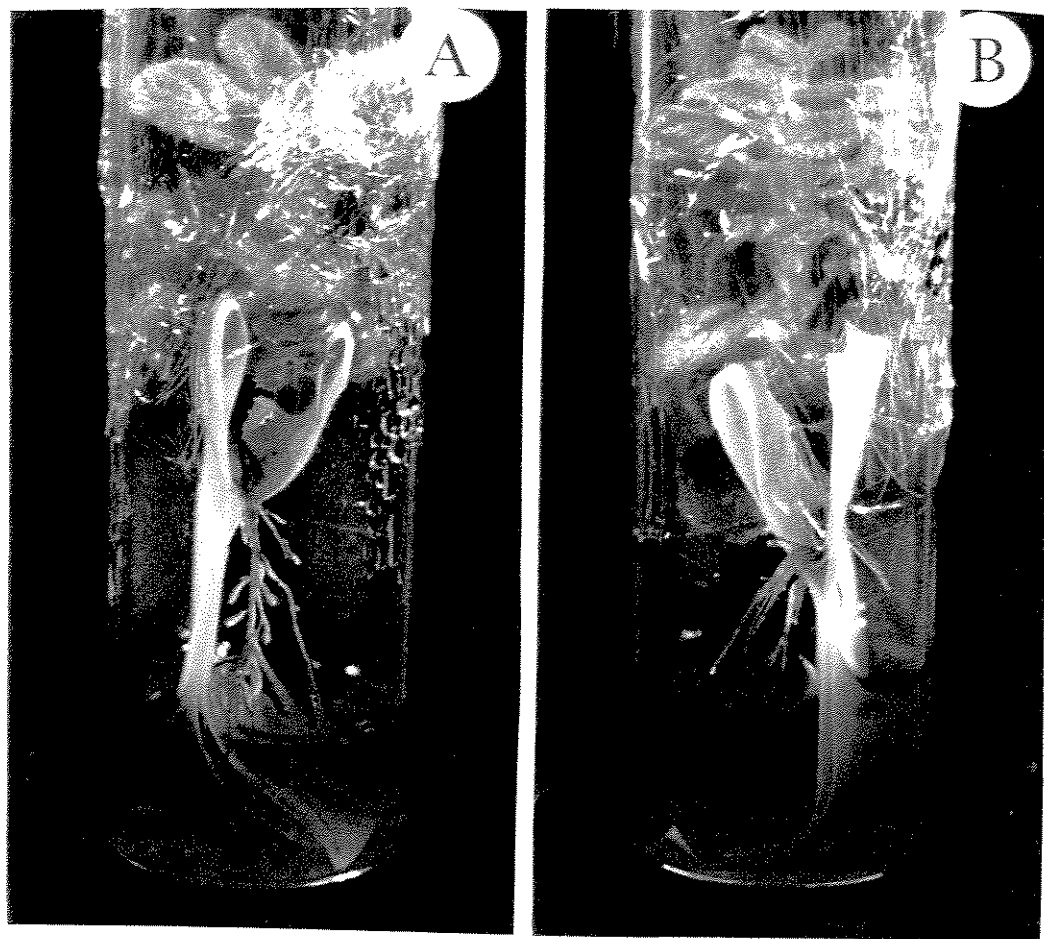


Figura 29. Efeito da concentração de nutrientes e da sacarose sobre o crescimento *in vitro* da espécie *S. allagophylla*: (A) meio B5 com a composição total dos nutrientes e suplementado com sacarose 3% (p/v); (B) meio B5 com a composição dos nutrientes diluída 50 vezes e suplementado com sacarose 4% (p/v).

DISCUSSÃO

As técnicas de cultivo *in vitro* têm sido amplamente utilizadas em pesquisa básica e aplicada, com a identificação e caracterização do papel dos hormônios e de fitorreguladores no desenvolvimento da planta (Krikorian, 1995), bem como de fatores como a concentração de nutrientes, pH e temperatura.

No estabelecimento inicial de uma cultura de tecidos de material não estudado, recomenda-se a utilização de diversas combinações de auxinas, citocininas e, a partir dos resultados obtidos, pode-se, em estudos posteriores, eliminar tratamentos (Handro & Floh, 1990). A concentração requerida de cada fitorregulador varia bastante de acordo com a espécie sendo cultivada, as condições de cultura e o fitorregulador utilizado.

Os tratamentos com fitorreguladores realizados neste trabalho evidenciaram alterações no crescimento *in vitro* de *S. allagophylla*, com a formação de calo na base do explante e de clorose nas folhas, bem como um aumento no número de brotos. Nos explantes cultivados nos tratamentos com interações de BA e ANA os calos foram menos espessos, em relação aos formados nos tratamentos com combinações de BA e AIA e BA com GA₃; ocorreu pouca brotação e a porcentagem de clorose não foi significativa. Menores concentrações dos hormônios ou mesmo a

ausência deles devem ser utilizadas nos experimentos onde a formação de calo não seja desejada.

Os efeitos observados nos tratamentos com fitorreguladores indicaram que o BA foi o que apresentou maior efeito na morfogênese e no crescimento dos explantes, determinando, sozinho ou em interação com outros fitorreguladores, valores significativamente maiores em relação ao controle e demais tratamentos para os parâmetros: formação de calo e brotos; aumento no número e comprimento das raízes e do comprimento do explante. O fitorregulador ANA também mostrou ser um indutor de tais parâmetros, sozinho ou combinado, exceto na formação de brotos. AIA e CCC não tiveram efeito significativo quando sozinhos e cinetina induziu o número e comprimento de raízes quando combinado com ANA.

O efeito indutor de BA e ANA sobre a morfogênese foi obtido em estudos com outras espécies, com a formação de brotos em *Rauwolfia micrantha* na combinação de BA e ANA e enraizamento em ANA sozinho (Sudha & Seeni, 1996); indução na formação de raízes e de brotos em *Lens culinares* em meio com ANA, e de calo e brotos na combinação de GA₃ e BA (Ahmad et al., 1997). Indução de calo e brotos em *Centella asiatica* em concentrações variadas de BA ou cinetina com ANA e de raízes em meio com ANA sozinho (Patra et al., 1998). Grattapaglia & Machado (1990) citam um trabalho realizado por Hu & Wang (1983), onde

verificaram que o BA foi a citocinina utilizada em 68% dos meios para cem espécies, cinetina em 23%.

O uso de BA na multiplicação *in vitro* de kiwi foi eficiente, elevando o número de folhas, número e comprimento de brotações (Zecca et al., 1993) e a combinação BA/ANA foi favorável para a indução de calo em *Tithonia diversifolia* (Pereira et al., 1993). Mercier et al. (1992) obtiveram a formação de calos e brotação em explantes da folha e do entrenó de *Gomphrena officinalis*, mantidos em meio MS com BA sozinho ou combinado com ANA e o enraizamento em brotos excisados e crescidos em meio com ANA sozinho. Estudos demonstrando a indução do enraizamento pelo fitorregulador BA, observada nos experimentos aqui demonstrados com *S. allagophylla*, não foram encontrados.

Sendo a espécie *S. allagophylla* possuidora de um órgão subterrâneo, as combinações de GA₃ com BA e BA com CCC foram realizadas objetivando principalmente a formação de microtubérculos e assim a obtenção de um protocolo eficiente de microtuberização. Lopez-Delgado & Scott (1997) citam que um método largamente utilizado para a indução de microtubérculos é o uso de uma citocinina e de um retardante do crescimento que inibe a biossíntese de GA₃ (no caso deste trabalho a interação BA e CCC). Xu et al. (1998), em estudos com microtuberização de batatas demonstraram que giberelinas, em baixas concentrações, possuem um papel regulador na microtuberização e citocininas um

papel indutor, sendo a interação GA_3 e BA favorável. Almeida (1994) obteve um número pequeno de microtubérculos em *S. allagophylla* em tratamentos com BA e fotoperíodo de 18h. Nos experimentos por nós realizados não ocorreu a microtuberização e outros fatores devem ser avaliados como, por exemplo, a concentração de sacarose.

O efeito indutor do GA_3 , quando sozinho, no comprimento do eixo principal, está em concordância com resultados de alguns estudos (Krikorian, 1995) indicando o efeito de GA_3 no crescimento em extensão de eixos caulinares. A inibição do crescimento da parte aérea e de raízes, quando GA_3 está combinado com BA, pode indicar uma inversão causada por GA_3 sobre o efeito indutor de BA para estes parâmetros. Gaspar et al. (1996) citam que giberelinas podem alterar os efeitos de auxinas, provavelmente o mesmo pode ter ocorrido quanto ao BA. Já o aumento na espessura do calo e do número de brotos observado nos explantes da figura 9, em meio com tais combinações de BA e GA_3 , talvez seja resultante de uma maior concentração de açúcar fornecido pelo GA_3 , elevando a indução destes parâmetros pelo BA. Em *Chrysanthemum* GA_3 induziu a brotação em calos devido ao seu efeito de armazenar o açúcar como amido, que é requerido pelo calo na formação de broto (Endress, 1994).

O efeito indutor do crescimento da parte aérea quando a razão $NH_4^+ : NO_3^-$, em relação às concentrações no meio MS, é

maior, sugere que a espécie *S. allagophylla* utiliza o amônio como fonte de nitrogênio. Segundo Furlani (1989) a absorção preferencial de NH_4^+ parece estar envolvida com o comportamento diferencial de espécies do cerrado em relação à tolerância ao íon alumínio e *S. allagophylla* indicou ser uma espécie que cresce em solo ácido, com alto teor do íon alumínio e que acumula este íon em suas folhas (capítulo 2, tabela 2 e 3). Para estes resultados o pH do meio também deve ser considerado, pois os efeitos das interações entre amônio e nitrato podem ser resultantes dos valores opostos no pH que estes sais determinam (Caldas & Caldas, 1976); sendo que para *S. allagophylla* valores mais baixos do pH do meio de cultivo *in vitro* é o adequado (capítulo 2, figura 1), provavelmente por determinar as condições para as quais está adaptada em seu habitat natural, o cerrado.

A indução no número e comprimento das raízes quando a razão $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ é maior pode estar relacionada com os valores mais altos do pH em tais meios. Islam et al. (1980), observaram efeitos prejudiciais do íon H^+ no crescimento de raízes em várias espécies crescidas em baixos valores de pH. Nesta razão, de concentração de NO_3^- maior que NH_4^+ , em relação ao meio MS, não ocorreu o efeito tóxico da maior concentração de sacarose sobre o crescimento da estaca, ocorrido quando na razão do meio meio MS e neste com maior concentração de NH_4^+ . Isto leva a pensar que talvez a menor concentração de NH_4^+ induz a planta a

utilizar a sacarose, por exemplo, para a formação de raízes e brotos.

A sacarose, além de ser uma fonte adequada de energia, em concentrações mais altas que a de 3% (p/v) comumente utilizada no cultivo *in vitro*, fornece osmolaridade favorável para o desenvolvimento de órgãos como, por exemplo, de microtubérculos (Khuri & Moorby, 1994). Nos experimentos aqui apresentados as concentrações de 8% e 10% foram tóxicas para a parte aérea e indutoras de raízes e brotos a partir da base do explante. Respostas semelhantes foram obtidas por Jusatis (1997) com o aumento da concentração de sacarose elevando o número de brotos em *Sawainsona formosa* e da aveia em estudos realizados por Romano *et al.* (1995). Snir & Machado (1980), citados por Grattapaglia & Machado (1990), verificaram uma dependência de sacarose para o enraizamento de macieira e Sassaki *et al.* (1998) observaram que o nível de carboidratos foi maior nas raízes do que nas partes aéreas em plantas crescendo em solo do cerrado. Provavelmente a maior concentração da sacarose tenha ocorrido na base do eixo principal, induzindo a remobilização de substâncias de reserva para esta região, permitindo, desta forma, o enraizamento e formação de brotos. Há evidências que regiões de crescimento possuem altas concentrações de sacarose (Salisbury, 1992).

Os resultados acima indicam que para se obter raízes em *S. allagophylla* é necessário o aumento da concentração de sacarose

no meio de cultivo; já para a microtuberização provavelmente seja mais adequado o cultivo de explantes em meio com concentrações mais altas de sacarose combinadas com fitorreguladores indutores da microtuberização. Alizadeh et al. (1998) verificaram que o meio MS acrescido de sacarose 8% e das auxinas ANA e AIB foi o indutor da microtuberização em *Dioscorea composita*.

Os resultados obtidos nos tratamentos em meio B5, não suplementado com fitorreguladores, indicaram ser este meio adequado ao meio de cultivo desta espécie, concordando com os resultados encontrados em estudos anteriores (capítulo 2, figura 8). As interações tanto de maiores concentrações de nutrientes (B5 100%) com menores de sacarose (3% p/v) quanto de menores concentrações de nutrientes (B5 diluído 50% e 75%) com maiores concentrações de sacarose (4% e 6% p/v), induzindo igualmente um maior crescimento dos explantes (em especial para o comprimento do eixo principal, número e comprimento das raízes), foi um dado interessante, indicando a necessidade de maior quantidade da fonte de energia quando em meios mais pobres de nutrientes. Outra resposta interessante obtida em tais tratamentos foi a formação de raízes secundárias, caráter não observado em nenhum dos tratamentos realizados com a espécie.

A ação do fotoperíodo no cultivo *in vitro* tem sido observado em estudos de floração (Flohr & Handro, 1990) e de

microtuberização (Ewing & Wareing, 1978; Charles & Rossignol, 1992), variando as espécies quanto ao requisito de dias curtos ou longos. Em *S. allagophylla*, a microtuberização foi obtida em trabalho realizado por Almeida (1994), quando explantes foram cultivados em fotoperíodo de dezoito horas de luz diária. Nos experimentos realizados, aqui citados, observou-se que os explantes cultivados no fotoperíodo de dezoito horas apresentaram significativamente maior clorose nas folhas. Esta resposta talvez seja um indício que o fotoperíodo de dezoito horas de luz diária possivelmente é o favorável para a microtuberização desta espécie, com a inibição do crescimento da parte aérea em favor da indução de formação de microtubérculos, com a remobilização de nutrientes para este órgão. O reaproveitamento dos nutrientes das folhas na produção de órgãos subterrâneos é uma estratégia adaptativa de plantas do cerrado (Mantovani & Martins, 1988).

CONCLUSÃO

No presente trabalho foi observado que os fitorreguladores auxina, citocinina e giberelina, bem como a concentração de sacarose, de nutrientes e a razão $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, possuem efeitos na morfogênese e no crescimento *in vitro* da espécie *S. allagophylla*. Os resultados evidenciaram que para a morfogênese *in vitro* desta espécie o fitorreguladore BA é o indicado e que a fonte de energia (neste caso a sacarose) é um fator importante para o seu crescimento *in vitro*.

Os resultados observados nos explantes cultivados no meio B5 (diluído ou não), com ausência de fitorreguladores, reforçam os dados obtidos em estudos anteriores, estabelecendo que este meio é o adequado para a manutenção *in vitro* de explantes da espécie *S. allagophylla*.

Como estratégias adaptativas *S. allagophylla* demonstrou ser uma espécie de crescimento lento, adaptada aos substratos ácidos e com baixa concentração de nutrientes, apresentando eficiência na reserva e utilização dos nutrientes.

LITERATURA CITADA

- Ahmad M., Fautrier, A.G., McNeil, D.L., Hill, G.D. & Burritt, D.J., 1997. *In vitro* propagation of *Lens* species and their F₁ interspecific hybrids. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 47: 169-176.
- 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. and 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, São Paulo, Brasil, tese de doutorado.
- 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. Hung. 48: 77-86.
- Caldas, R.A. & Caldas, L.S., 1976. Nitrate, ammonium and kinetin effects on growth and enzyme activities of Paul's Scarlet Rose Callus. Physiol. Plant. 37:111-116.
- Caldas, L.S., Haridasan, P. & Ferreira, M.E., 1990. Meios Nutritivos. In: Técnicas e Aplicações da Cultura de Plantas (A.C. Torres & L.S. Caldas, eds), ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, Brasília, p.37-70.

Charles, G., Rossignol, L. & Rossignol, M., 1991. Environmental effects on potato plants *in vitro*. J. Plant Physiol. 139: 708-713.

Charrière, F. & Hahne, G., 1998. Induction of embryogenesis versus caulogenesis on *in vitro* cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. Plant Sci. 137:63-71.

Dias, T.A.B., Vieira, R.F., Martins, M.V.M., Mello, C.M.C., Boaventura, M.C., Ramos, A.E., Assis, M.C., Ramos, F.A., Monteiro, P.P. & Reis, M.C.L., 1996. Conservação *ex situ* de recursos genéticos do cerrado: plantas ornamentais e meliponíneos. In: VIII Simpósio Sobre o Cerrado, Brasília, Brasil, anais, p.195-197.

DiCosmo, F. & Misawa, M., 1995. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. Biotechnol. advances 13: 425-453.

Endress, R., 1994. Plant regeneration: morphogenesis. In: Plant Cell Biotechnology (R. Endress, ed), Springer-Verlag, Berlin, p.99-120.

Escalante, B.Z. & Langille, A.R., 1995. Role of growth regulators in *in vitro* rhizome growth of potato. HortScience 30(6): 1248-1250.

Ewing, E.E. & Wareing P.F., 1978. Stolon and tuber formation on potato (*Solanum tuberosum* L.) cuttings in response to photoperiod. Plant Physiol. 61: 348-353.

Fay, M.F., 1993. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation?. Biol. Conserv. 3: 176-183.

Ferri, M.G., 1971. Problemas de fisiologia ecológica dos cerrados. In: Simpósio Sobre Cerrado, São Paulo, Brasil, resumos, p.229-231.

Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Dietrich, S.M.C., Chu, E.P., Carvalho, M.A., Vieira, C.C.J. & Graziano, T.T., 1986. Reserve carbohydrates in underground organs of native Brazilian plants. Revta brasil. Bot. 9:159-166.

Floh, E.I.S. & Handro, W., 1990. Floração *in vitro*. In: Técnicas e Aplicações da Cultura de Plantas (A.C. Torres & L.S. Caldas, eds), ABCTP/EMBRAPA-CNPH, Brasília, p.213-226.

Fry, S.C. & Streit, H.E., 1980. Gibberellin-sensitive suspension cultures. Plant Physiol. 65:472-477.

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.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. & Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exptl. Cell Res. 50: 151-158.

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.

- Gaspar, T., Kevers, C., Greppin, C.P.H., Reid, D.M. & Thorpe, T.A., 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 32:272-289.
- Goodland, R., 1979. Análise ecológica da vegetação do cerrado. In: *Ecologia do Cerrado* (R. Goodland & M.G. Ferri, eds), EDUSP, p.61-160.
- Grattapaglia, D. & Machado, M.A., 1990. Micropropagação. In: *Técnicas e Aplicações da Cultura de Plantas* (A.C. Torres & L.S. Caldas, eds), ABCTP/EMBRAPA-CNPB, Brasília, p.99-169.
- Handro, W. & Floh, E.I.S., 1990. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro* In: *Técnicas e Aplicações da Cultura de Plantas* (A.C. Torres & L.S. Caldas, eds), ABCTP/EMBRAPA-CNPB, Brasília, p.203-212.
- Hdider, C. & Desjardins, Y., 1994. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 36:27-33.
- Islam, A.K.M.S., Edwards, D.G. & Asher, C.J., 1980. PH optima for crop growth - results of a flowing solution culture experiment with six species. *Plant Soil* 54:339-357.
- Jeannin, G., Bronner, R. & Hahne, G., 1995. Somatic embryogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated *in vitro*: role of the sugar. *Plant Cell Reports* 15:200-204.

- Jusatis, M., 1997. Micropropagation of adult *Swainsona formosa* (Leguminosae: Papilionoideae Galegeae). In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant 33:213-220.
- Khuri, S. & Moorby, J., 1995. Investigations into the role of sucrose in Potato cv. Estima microtuber production in vitro. Ann. Bot. 75:295-303.
- Koda, Y. & Okazawa, Y., 1988. Detection of potato tuber-inducing activity in potato leaves and old tubers. Plant Cell Physiol. 29: 924-974.
- Koda, Y., Takahashi, K, & Kikuta, Y., 1994. Involvement of jasmonic acid and related compounds in the tuberization of jerusalem artichoke plants (*Helianthus tuberosus* L.). Jpn. J. Crop Sci. 63(2): 333-338.
- Kozovits, A.R., Bustamante, M.M.C., Silva, L.F., Duarte, G.F., Castro, A.A. & Magalhães, J.R., 1996. Nitrato e amônio no solo e sua assimilação por espécies lenhosas em uma área de cerrado submetida a queimadas prescritas. In: Impactos de Queimadas em Áreas de Cerrado e Restinga (H.S. Miranda, C.H. Saito & B.F.S.Dias, orgs), UnB/ECL, Brasília, p.137-147.
- Krikorian, A.D., 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Plant Hormones (P.J. Davies, ed), Kluwer Academic Publishers, New York, p.774-796.
- Lopez-Delgado, H. & Scoot, I.M., 1997. Induction of in vitro tuberization of potato microplants by acetylsalicylic acid. J. Plant Physiol. 151:74-78.

- Mader, J.C., 1995. Polyamines in *Solanum tuberosum* in vitro: free and conjugated polyamines in hormone-induced tuberization. J. Plant Physiol. 146: 115-120.
- Mantovani, W. & Martins, F.R., 1988. Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji Guaçu, Estado de São Paulo. Revta brasil. Bot. 11:101-112.
- Mercier, H., Vieira, C.C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., 1992. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a Brazilian medicinal plant. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 28: 249-254.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Patra, A., Rai, B., Rout, G.R. & Das, P., 1998. Successful plant regeneration from callus cultures of *Centella asiatica* (Linn.) Urban. Plant Growth Regulation 24:13-16.
- Pereira, P.S., Pereira, A.M.S., Dias, D.A. & França, S.C., 1993. Influência de auxinas, citocininas e luz na indução e manutenção de calos de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. R. Bras. Fisiol. Veg. 5(1): 102.
- Romano, A., Noronha, C. & Martins-Loução, M.A., 1995. Role of carbohydrates in propagation of cork oak. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 40:159-167.
- Salisbury, F.B., 1992. Transport of nutrients directed by hormones. In: Plant physiology. (F.B. Salisbury & C.W. Ross,

- eds), 4rd Edition, Wadsworth Publishing Company, California, p. 161-184.
- Sassaki, R.M., Zaidan, L.B.P., Felipe, G.M. & Cesarino, F., 1996. Efeito do fotoperíodo, tipo de solo e época do ano no crescimento inicial da espécie arbórea do cerrado, *Dalbergia miscolobium*. *Revta brasil. Bot.* 19:193-201.
- Sassaki, R.M. & Felipe, G.M., 1998. Response of *Dalbergia miscolobium* Benth seedlings, a cerrado tree species, to mineral nutrient supply. *Revta brasil. Bot.* 21:65-72.
- Skoog, F. & Miller, C.O., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11:118-131.
- Sudha, C.G. & Seeni, S., 1996. *In vitro* propagation of *Rauwolfia micrantha*, a rare medicinal plant. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 44:243-248.
- 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.* 117:574-584.
- Zecca, A.G.D., Nachtigall, J.C., Figueiredo, S.L.B. & Fortes, G.R.L., 1993. Multiplicação *in vitro* de kiwi (*Actinidia delíciosa*) CV. Tomuri. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 5(1): 101.