

EMÍLIA ORDONES LEMOS SALEH



CULTIVO *IN VITRO*, CRESCIMENTO E
FLORAÇÃO *IN VIVO* DE ESPÉCIES DE *Clusia* L.
(GUTTIFERAE)

o exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
Emília Ordones Lemos Saleh
e aprovada pela Comissão Julgadora
11/10/99

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

Orientadora: Prof^a. D^{ra}. Simone Liliane Kirszenzaft Shepherd

Campinas - SP

1999



UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:			
V.	Ex.		
TOMBO BC/	37647		
PROC.	229.199		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	06/05/99		
N.º CPD			

CM-00123011-3

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Saleh, Emília Ordones Lemos

S32c Cultivo *in vitro*, crescimento e floração *in vivo* de espécies de *Clusia* L. (GUTTIFERAE)/Emília Ordones Lemos Saleh. -- Campinas, SP:[s.n.], 1999.
119f.:ilus.

Orientadora: Simone Liliane Kirszenzaft Shepherd

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.

Instituto de Biologia.

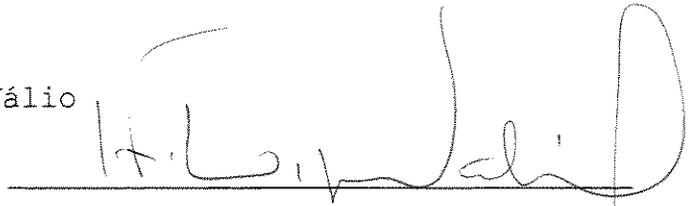
1. *Clusia*. 2. Plantas medicinais. 3. *In vitro*. 4. Fotoperiodismo.
I. Shepherd, Simone Liliane Kirszenzaft. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 06 de abril de 1999.

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Prof. Dr. Ivany Ferraz Marques Válio



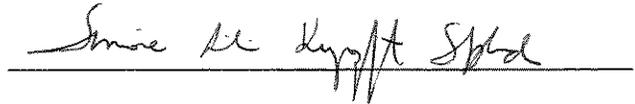
A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Ivany Ferraz Marques Válio', written above a horizontal line. A long vertical line extends downwards from the right end of the signature line.

Profa. Dra. Lilian Beatriz Penteado Zaidan



A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Lilian B. Zaidan', written above a horizontal line.

Profa. Dra. Simone Liliane Kirszenzaft Shepherd



A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Simone L. Kirszenzaft Shepherd', written above a horizontal line.

SUPLENTE:

Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins

Este trabalho ofereço

*aos meus pais,
às minhas irmãs
à minha avó querida
e ao Carlos.*

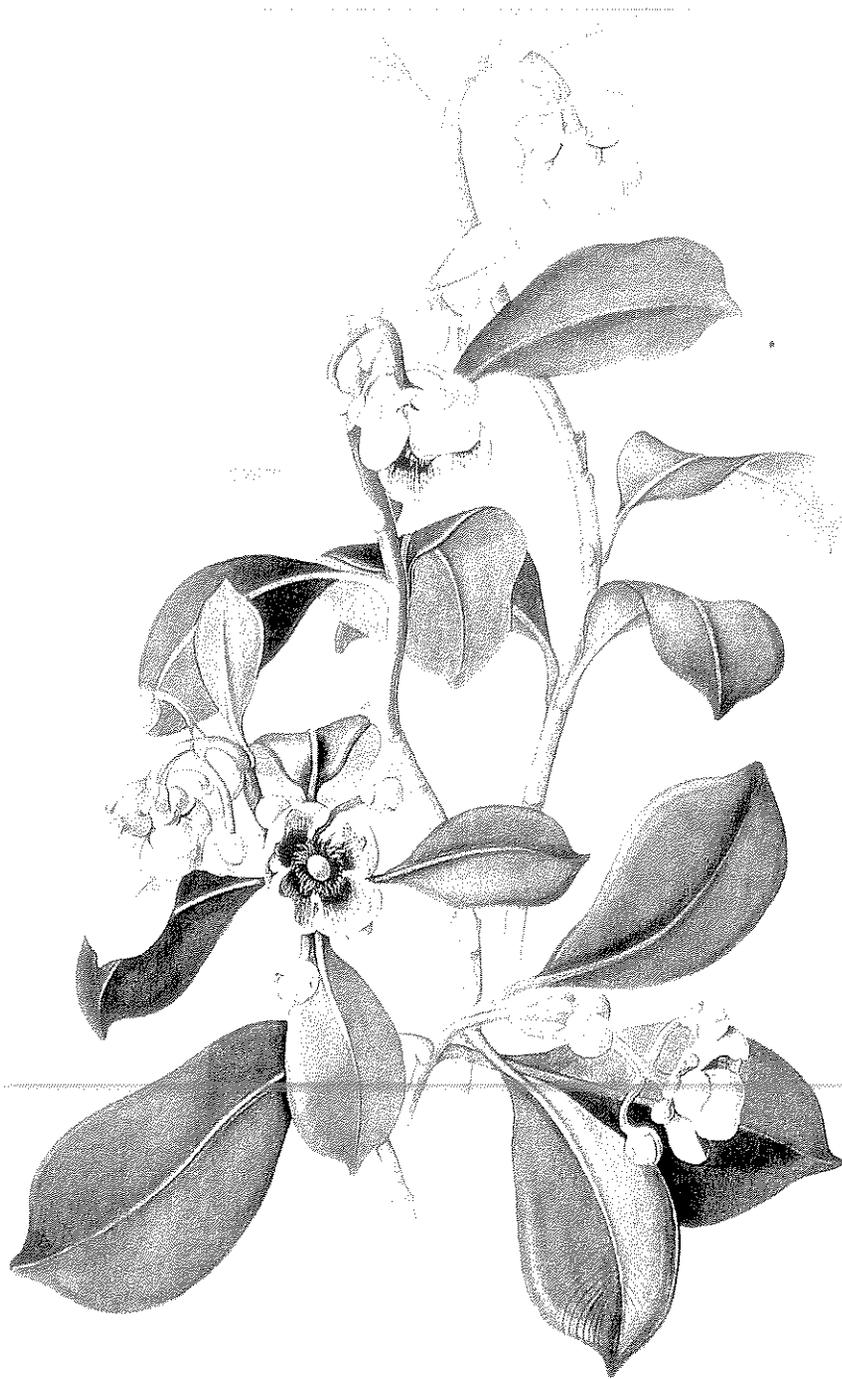
Com amor.

Pintura em lápis e guache sobre papel de Margaret Mee

Margaret Mee - Return to the Amazon

Ruth Stiff (ed.)

Royal Botanic Gardens Kew, London, 1996.



ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ix
ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
Capítulo 1	5
<i>Cultivo in vitro de Clusia nemorosa, Clusia grandiflora e Clusia spiritu-sanctensis</i>	5
<i>I: Estabelecimento de condições de cultivo in vitro</i>	5
INTRODUÇÃO	5
MATERIAL E MÉTODOS	9
RESULTADOS	13
DISCUSSÃO	21
CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
Capítulo 2	29
<i>Cultivo in vitro de Clusia nemorosa, Clusia grandiflora e Clusia spiritu-sanctensis</i>	29
<i>II: Cultivo de raízes em meio líquido, cultivo de folhas: formação de calos e regeneração</i>	29
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	33
RESULTADOS	39
DISCUSSÃO	63
CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
Capítulo 3	71
<i>Respostas fotoperiódicas de espécies nativas do gênero Clusia L. (GUTTIFERAE)</i>	71
INTRODUÇÃO	71

MATERIAL E MÉTODOS	75
RESULTADOS	81
DISCUSSÃO	93
CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e iluminação que me permitiram realizar e concluir este trabalho.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado e à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela oportunidade de complementar a minha formação.

Agradeço enormemente a Simone Liliane K. Shepherd, minha orientadora, pelo companheirismo, compreensão e amizade que transformaram estes 2 anos de estudo e pesquisa em tempo de crescimento profissional e pessoal.

Agradeço a Dulce R. G. Joaquim, técnica do laboratório, pela inestimável ajuda, sem a qual grande parte deste trabalho não teria sido possível.

Agradeço aos professores do Departamento de Fisiologia Vegetal, especialmente aos professores Jorge Vega, pelo auxílio com as fotos, e Ivany F. Marques Válio, pelos conselhos.

Agradeço a Denise Cristina da Silva e Sebastiana R. V. dos Santos e demais funcionários do Departamento e das Secretarias de Pós-Graduação.

Aos colegas da Fisiologia Vegetal e da Botânica, o meu muito obrigada pelo carinho e solidariedade. Obrigada principalmente a Márcia Aparecida G. Novaes, Ana Paula Pellegrino e Daniela Argolo Marques, companheiras de fluxo e autoclave, de apreensões e certezas.

Agradeço também à Profa. Dra. Eliana R. Forni Martins e ao Dr. Volker Bittrich pelo apoio, esclarecimentos e, finalmente, pela leitura crítica da tese.

Agradeço à Dra. Lilian B. P. Zaidan, pesquisadora do Instituto de Botânica de SP, por ter colocado à minha disposição todos os recursos de que necessitei, resultando em grande auxílio à minha pesquisa. Agradeço também ao colega Fabiano Cesarino pelo carinho que teve pelas minhas plantas e a D. Helena Cirilo da Silva e Josimara N. Rondon igualmente pelo cuidado com as plantas.

A Ellen Wang o meu mais sincero obrigada pelo apoio, paciência, amizade e compreensão.

Ao Carlos, por todos os momentos, muito obrigada!

Um abraço carinhoso a todos!

ABREVIATURAS

MS: solução nutritiva de Murashige & Skoog (1962)

½ MS: solução nutritiva original de Murashige & Skoog (1962)
diluída à metade

B5: solução nutritiva de Gamborg *et al.* (1968)

ANA: Ácido naftalenoacético

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

BA: 6-benziladenina

KIN: Cinetina (6-furfuriladenina)

GA₃: Ácido giberélico

IAC: Instituto Agronômico de Campinas

T: temperatura

NI: Noite interrompida

d.p.: desvio padrão

C.V.: Coeficiente de variância

d.m.s.: diferença mínima significativa

p/α: nível de significância

F: teste de variância

χ²: Qui-quadrado

RESUMO

As espécies do gênero *Clusia* L. (Guttiferae) se caracterizam por produzir compostos do metabolismo secundário de comprovada atividade microbicida. Para facilitar o estudo e caracterização destes compostos secundários procurou-se identificar respostas fisiológicas relacionadas a sua produção.

A primeira parte deste estudo envolveu o estabelecimento de um protocolo padrão para cultura *in vitro* de espécies nativas deste gênero. A segunda parte do estudo tratou da influência do fotoperíodo na floração de *C. nemorosa* e *C. fluminensis*.

C. nemorosa foi a espécie escolhida como padrão para o cultivo *in vitro*. Estudos de germinação em condições controladas permitiram a obtenção de material jovem e de fácil assepsia. As folhas jovens de plantas germinadas em laboratório e crescidas em casa-de-vegetação foram a melhor fonte de explantes para o cultivo *in vitro*. Testes com combinações de fitorreguladores para formação de calo em três espécies permitiram escolher combinações com duas finalidades distintas: ANA x BA, capaz de formar calos com exsudato e 2,4-D x BA capaz de formar calos friáveis. O cultivo de raízes em meio líquido foi favorecido em meio nutritivo B5 com 2,0mg/L de ANA.

Os estudos de fotoperíodo levaram à caracterização de *C. nemorosa* como uma espécie de dias longos, com fotoperíodo crítico de 10h. Embora plantas de *C. fluminensis* não tenham florescido em

resposta aos tratamentos fotoperiódicos (planta de dias ^{xiv}
neutros), estas responderam com mudanças no padrão de crescimento
vegetativo.

ABSTRACT

The genus *Clusia* L. (Guttiferae) is characterized by species that produce secondary metabolic compounds of recognized biological activity. An attempt was made to identify patterns of physiological response related to the compound production in order to facilitate their study and characterization.

This study investigated two physiological aspects of *Clusia* species: 1) the establishment of a standardized protocol for *in vitro* culture of native species; 2) the influence of photoperiod on flowering in *C. nemorosa* and *C. fluminensis*.

Clusia nemorosa was chosen for *in vitro* culture experiments. Germination studies under controlled conditions made it possible to obtain young plant material with easy asepsis. The young leaves of plants germinated in the laboratory and grown in a greenhouse were the best explant source for *in vitro* culture. Combinations of plant growth regulators intended to induce callus formation in three species were tested, allowing the selection of combinations with two distinct purposes: NAA x BA, capable of producing callus containing exudate and 2,4-D x BA, to produce friable callus. Root culture in liquid medium was favoured in B5 medium with 2.0mg/L of NAA.

Photoperiod studies showed *C. nemorosa* to be a long-day plant with a critical daylength of about 10h. Although *C. fluminensis* plants did not flower in response to photoperiod

treatments (day-neutral plant), they showed changes in the ^{xvi} pattern of vegetative growth.

INTRODUÇÃO GERAL

A preservação da biodiversidade de ecossistemas tropicais pressupõe a existência de justificativas com embasamento científico suficiente para superar os interesses econômicos. Conhecer a potencialidade das famílias, gêneros ou espécies de plantas nativas, seja para alimentação, uso medicinal ou outros empregos, vem ampliar o conjunto de conhecimentos utilizados como argumentos na defesa da biodiversidade da flora brasileira.

O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar respostas fisiológicas de plantas de *Clusia* que possam estar relacionadas com a produção de metabólitos secundários. Entre as espécies do gênero estudadas estão duas que ocorrem na Floresta Amazônica: *C. nemorosa*, que ocorre também no nordeste e *C. grandiflora*, que ocorre também nas Guianas. A terceira espécie estudada, *C. fluminensis*, ocorre em formação de restinga no litoral do Rio de Janeiro.

As mudanças fisiológicas relacionadas ao início do período reprodutivo das plantas levam a alterações nos metabolismos primário e secundário. Diante disto, procurou-se estabelecer um padrão de resposta de floração para espécies de *Clusia* em função do período diário de luz (fotoperíodo).

A obtenção de calos (tecidos indiferenciados) via cultura de tecidos pode levar à produção de compostos ativos não presentes

inicialmente na planta *in vivo*, pois o metabolismo secundário pode se alterar pelo cultivo *in vitro*.

O material de *Clusia* L. foi retirado de uma coleção de 15 espécies deste gênero do Centro Experimental (Fazenda Santa Elisa) do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), SP (22°49'45"S, 47°06'33"W). Deste material foram obtidas diretamente folhas e estacas que, após enraizamento, foram utilizadas para estudos de fotoperíodo. Foram obtidas plantas jovens (fonte de explantes para o cultivo *in vitro*) a partir da germinação de sementes. O esquema da Figura 1 mostra as várias etapas deste trabalho no cultivo de plantas *in vivo* e *in vitro*.

Este trabalho será apresentado em 3 Capítulos. O primeiro e o segundo capítulos tratam dos estudos feitos *in vitro*. O Capítulo 1 trata do estabelecimento de um protocolo de obtenção de fonte de explantes para a cultura de tecidos. O Capítulo 2 apresenta as respostas *in vitro* de crescimento de calos e de raízes. O Capítulo 3 aborda o padrão de respostas *in vivo* aos tratamentos fotoperiódicos.

Métodos empregados no estudo de Fisiologia de Espécies de *Clusia in vitro* e *in vivo*

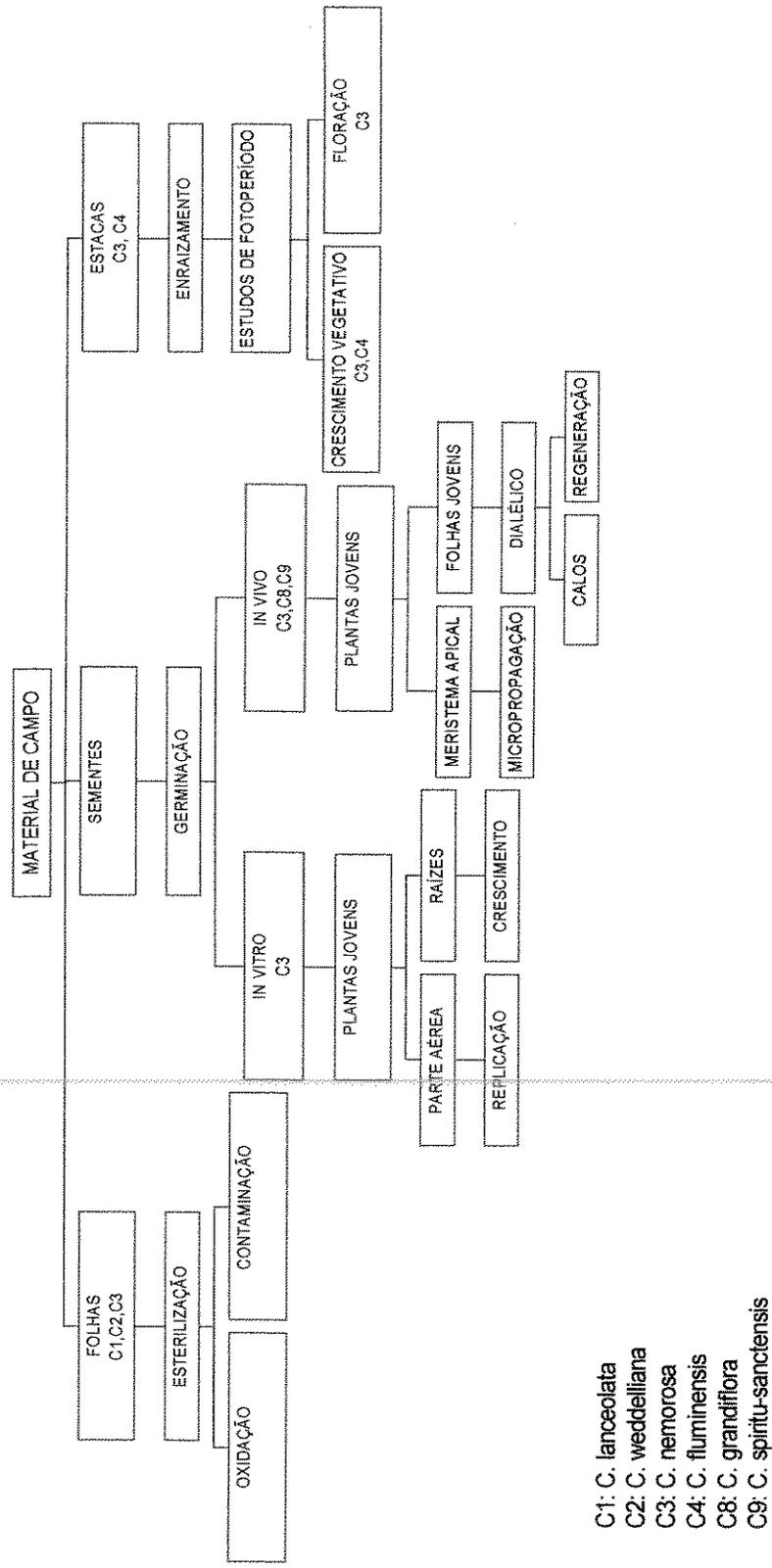


Figura 1: Esquematisação das fases experimentais do estudo de respostas de *Clusia L. in vitro* e *in vivo*.

Capítulo 1

Cultivo *in vitro* de *Clusia nemorosa*, *Clusia grandiflora* e *Clusia spiritu-sanctensis*

I: Estabelecimento de condições de cultivo *in vitro*

INTRODUÇÃO

O gênero *Clusia* L., da família Guttiferae, possui cerca de 250 espécies de distribuição neotropical, do sul da Flórida ao sul do Brasil (BITTRICH & AMARAL, 1996). No Brasil, há cerca de 60 espécies nativas (BITTRICH, 1995). Estas plantas têm sido utilizadas como ornamentais devido à grande beleza e diversidade de suas flores, mas, principalmente, devido à presença de folhas glabras e coriáceas de um verde muito intenso e brilhante.

Podem ser árvores, arbustos, muitas vezes hemi-epífitas, raramente lianas e ocorrer em regiões de campos rupestres, restinga, mata amazônica e mata atlântica. As espécies são dióicas, mas existe uma espécie com populações ginodióicas (flores hermafroditas e femininas) (BITTRICH, 1997). Um grande número de espécies oferece resina como recompensa a seus agentes polinizadores, que são principalmente abelhas; outras oferecem pólen ou néctar. Está ainda associada à flor a presença de óleos cuja função principal parece ser a de proteger o pólen do contato

com a resina ou servir de veículo para que o mesmo possa aderir ao polinizador ("pollenkit", BITTRICH & AMARAL, 1997).

O estudo dos compostos secundários da resina de *C. nemorosa*, *C. rosea*, *C. grandiflora*, *C. insignis*, *C. spiritu-sanctensis* e *C. pernambucanensis* permitiu a identificação de uma classe de compostos com atividade biológica, a classe das benzofenonas (OLIVEIRA et al., 1996). As benzofenonas possuem atividade anti-HIV (GUSTAFSON et al., 1992) e testes com a resina floral de *Clusia* e a clusianona isolada (benzofenona poli-isoprenilada de *Clusia*) revelaram uma atividade biológica inibitória no crescimento de microorganismos (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*). Estes dados parecem confirmar a hipótese de que as abelhas utilizam as resinas florais como material para a construção do ninho e como meio de evitar a infestação dos mesmos por microorganismos (MARSAIOLI et al., 1997). TOMÁS-BARBERÁN et al. (1993) investigaram a origem vegetal dos constituintes do própolis da Venezuela por análise em CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e concluíram que os seus constituintes são provenientes, em sua maioria, de duas espécies de *Clusia* daquele país: "*C. major*" (cf. *C. grandiflora*) e *C. minor*.

Além das já citadas atividades antimicrobiana e anti-HIV, outros estudos comprovam a aplicação medicinal das espécies de *Clusia*. GONZÁLEZ & MATAMOROS (1996) investigaram a utilização do extrato aquoso de folhas de *C. coclensis* contra pressão arterial

pela medicina popular na Costa Rica. Estes pesquisadores verificaram que doses de extrato foram capazes de reduzir a pressão arterial e a frequência cardíaca de ratos hipertensos. Recentemente, CHEDIER *et al.* demonstraram a atividade tripanossomicida (1998^a), antineoplásica (1998^b) e anti-inflamatória (1998^c) de extratos de *C. criuva*.

O interesse na produção de fármacos utilizando-se técnicas de biotecnologia de plantas se deve ao fato de estes compostos serem necessários em pequenas quantidades e de serem produtos de alto valor comercial. O potencial da cultura de células vegetais na produção desses metabólitos tem estado sob intensa investigação e tem se mostrado útil não só na obtenção de compostos secundários, mas também na elucidação de vias metabólicas (ROBERTS 1988).

O estudo do comportamento de tecidos vegetais em cultura passa por diversas fases, sendo a fase de obtenção de material estéril fundamental para o prosseguimento do trabalho. Para que os resultados sejam obtidos a cultura deve estar livre de contaminantes, fungos e bactérias, que se aproveitam do meio rico competindo com as células vegetais ou simplesmente alterando a sua composição.

Buscando facilitar o estudo dos compostos do metabolismo secundário de *Clusia* e possibilitar seu uso posterior, foi fundamental o estabelecimento de algumas espécies do gênero *in vitro*. Para tanto foram feitos:

- estudos preliminares de germinação para cultivo das espécies em casa-de-vegetação;
- estabelecimento de plantas estéreis *in vitro* a partir da germinação;
- estabelecimento de plantas estéreis *in vitro* a partir da cultura de submeristemas apicais.

Estes procedimentos estão descritos neste capítulo para as espécies *C. nemorosa* G. Mey., *C. grandiflora* Splitg. e *C. spiritu-sanctensis* G. Mariz & B. Weinberg.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de explantes a partir da germinação *in vivo* de *C. nemorosa*, *C. grandiflora* e *C. spiritu-sanctensis*

Frutos maduros de *C. nemorosa* (plantas hermafroditas) foram obtidos na Coleção de *Clusia* do Centro Experimental (Fazenda Santa Elisa) do Instituto Agrônomo de Campinas (22°49'45"S, 47°06'33"W) em abril de 1997. Os frutos foram abertos em laboratório e as sementes foram retiradas e colocadas em água destilada pelo período de 8h para facilitar a separação do arilo. As sementes retiradas foram tratadas com solução de Benlate (fungicida) na concentração de 10g/L por 30min, sob agitação contínua. Só então sofreram os tratamentos abaixo:

- A) Semente nua: escarificação total da testa, feita manualmente com auxílio de pinça e bisturi;
- B) Escarificação parcial da testa, com apenas uma cisão na testa feita com bisturi;
- C) Semente intacta: sem escarificação.

As sementes foram colocadas para germinar em placas de petri (9cm de diâmetro) com papel de filtro (Whatman, nº3) umidecido com 5ml de água destilada, 10 sementes por placa. No primeiro experimento, 3 repetições de cada tratamento (A, B e C) foram colocadas em luz contínua e 3 repetições em escuro total em câmara de crescimento à temperatura de 25°C ± 2°C. A germinação

foi considerada como a protrusão da radícula e foi avaliada após 7 dias. Os mesmos procedimentos foram feitos num segundo experimento, onde cada tratamento teve apenas uma repetição. Foi feito teste do χ^2 comparando cada um dos resultados da germinação.

Sementes de *C. grandiflora* e de *C. spiritu-sanctensis* foram postas para germinar segundo o protocolo desenvolvido para *C. nemorosa*, apenas com o tratamento A (sementes nuas).

As plântulas das três espécies foram transplantadas com a idade de 10 dias para substrato inerte (Vermiculita). Estas foram mantidas em casa-de-vegetação sob condições de luz e temperatura ambientes de março de 1997 a dezembro de 1998. As plantas foram regadas 2 vezes por semana com solução nutritiva (HOAGLAND & ARNON, 1938) durante todo este período.

Obtenção de explantes a partir do cultivo *in vitro* de *C. nemorosa*

Sementes nuas (tratamento A) foram esterilizadas com solução de Hipoclorito de Sódio 10% (v/v) por 15min e enxaguadas 4 vezes com água destilada. Foram postas para germinar em placas de petri (9cm de diâmetro) e após 7 dias as plântulas foram transferidas em condições assépticas para o meio básico. As plantas assim estabelecidas foram mantidas em condições de 16h de luz, à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Esterilização de explantes foliares de *C. nemorosa*, *C. grandiflora* e *C. spiritu-sanctensis* e submeristemas de *C. nemorosa*

O par de folíolos mais apical, ainda não totalmente expandidos, foi excisado das plântulas mantidas em casa-de-vegetação com auxílio de bisturi. Os folíolos mais jovens foram mantidos unidos para preservação do meristema e os folíolos mais expandidos foram separados. Os folíolos e submeristemas (meristemas apicais protegidos pelo par de folíolos não expandido) foram lavados com água destilada e esterilizados de acordo com os procedimentos a seguir: álcool 70 % (v/v) por 10s, enxágue com água destilada autoclavada, solução de Hipoclorito de Sódio 15% (v/v) com 2 gotas de Tween 20 para 100ml durante 12min, enxágue mais 4X com água destilada.

Preparação de meio básico

O meio básico utilizado foi o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com 30g/L de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH e HCl (1N) após o acréscimo dos fitorreguladores e só então o ágar foi colocado na concentração de 1% (p/v). Os meios foram autoclavados por 20 min à temperatura de 121°C

Cultura de submeristemas em concentrações combinadas de BA x GA₃ para *C. nemorosa*, utilizada como planta-padrão

Submeristemas de plantas de 8 semanas (fig. 2b) mantidas em casa-de-vegetação foram isolados e esterilizados como especificado acima. Após a esterilização, foram inoculados em meio básico acrescentado de concentrações combinadas de GA₃ x BA, fatorial 3 x 3. As concentrações utilizadas foram:

GA₃: 0,1mg/L; 1,0mg/L e 10,0mg/L

BA: 0,1mg/L; 0,5mg/L e 1,0mg/L.

Foram feitas quatro repetições de cada combinação hormonal. Os submeristemas depois de inoculados nos meios foram colocados sob condições de 8h e 18h de luz, ficando 2 repetições para cada tratamento. A temperatura foi mantida em 25°C ± 1°C na câmara de crescimento. A avaliação foi feita após 30 dias. Esse experimento foi repetido, com duas repetições por tratamento, na condição de 18h de luz.

RESULTADOS

A germinação das sementes de *Clusia* foi amplamente favorecida pela luz (resposta fotoblástica positiva). A germinação também ocorreu no escuro, porém em menor proporção (fig. 1). Houve grande interação entre o tipo de escarificação e a condição de luz. A escarificação parcial da testa e sementes mantidas intactas apresentaram resposta fotoblástica positiva de germinação com resultados significativos pelo teste do χ^2 . As sementes nuas germinaram tanto no claro como no escuro, não apresentando resposta fotoblástica (a retirada da testa significou a quebra da fotodormência). A germinação das sementes nuas e das sementes parcialmente escarificadas foi igual sob condição de luz contínua, com 80% de sementes germinadas ao final de uma semana. No entanto, estes tratamentos interferiram no tempo do desenvolvimento da plântula, que foi mais lento quando as sementes foram escarificadas parcialmente.

As plantas cultivadas *in vitro* apresentaram um desenvolvimento lento da parte aérea, com média de 3 pares de folhas aos 12 meses. No entanto, foi grande o crescimento das raízes, que, no mesmo período, chegaram a cobrir todo o meio de cultura (fig. 2a). Devido às características desta resposta, as plantas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes radiculares em experimentos posteriores.

Estudos preliminares de esterilização de folhas adultas coletadas no campo de *C. nemorosa*, *C. weddelliana* e *C. lanceolata* mostraram que a cultura de tecidos a partir deste material é inviável. O índice de contaminação em cultura foi alto mesmo sob métodos fortes de esterilização e apenas 20% dos explantes permaneceu viável. O resultado da esterilização desenvolvida para folíolos e meristemas apicais de plantas em casa-de-vegetação foi eficiente (resultou em menos de 1% de contaminação) e manteve a viabilidade do material.

Os submeristemas de *C. nemorosa* foram favorecidos pelas condições de cultivo de 18h de luz que promoveu o desenvolvimento meristemático, o alongamento do caule e a formação de folhas novas. A total ausência de fitorreguladores no meio (controle) reduziu a viabilidade do explante e prejudicou o desenvolvimento do submeristema, que apresentou sinais de clorose nas duas condições de luz. O aparecimento de clorose nas folhas, com exceção do controle, ocorreu exclusivamente sob fotoperíodo de 8h. Tanto em condições de 8h de luz diárias quanto em 18h de luz, as maiores concentrações de BA favoreceram o desenvolvimento de novos pares de folhas, sendo que este resultado é mais evidente sob fotoperíodo de 18h. O aparecimento de calo ou a oxidação na base do explante parece ser uma resposta ao dano sofrido na retirada do explante e não uma resposta ao tratamento. No fotoperíodo de 18h pode ser visualizado como o alongamento do eixo principal (caule) foi influenciado pelo aumento da

foi influenciado pelo aumento da concentração de GA₃ (fig. 3). Na fig. 3, observa-se também a formação de uma plantinha completa com raiz, mas apenas quando cultivada sob tratamento de 18h de luz (fig. 3b) e sob baixa concentração de BA (0,1mg/L).

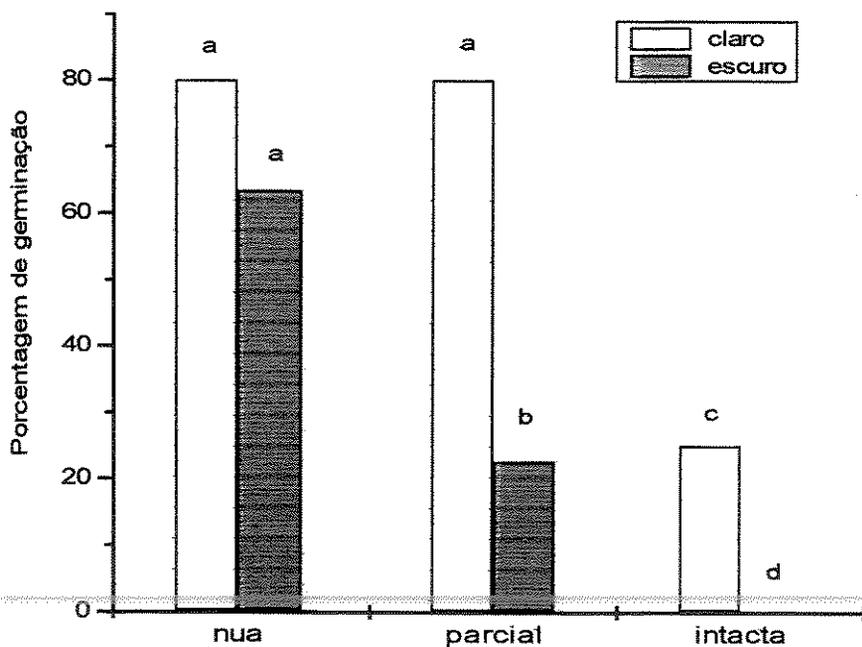


Figura 1: *Clusia nemorosa*, influência do tipo de escarificação e das condições de luz na germinação de sementes, porcentagem de germinação após 7 dias, T 25°C ± 2°C (julho/97). Letras iguais indicam resultados semelhantes entre os tratamentos, pelo teste do χ^2 , com α 1%.

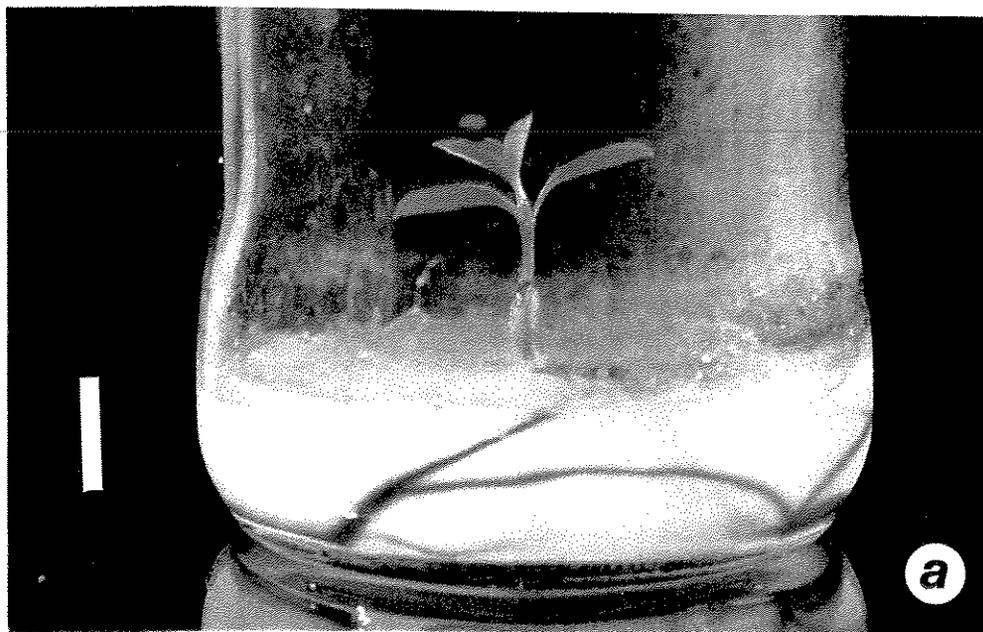


Figura 2: Aspecto de plantas de *C. nemorosa* obtidas da germinação de sementes: a) *in vitro*: cultivadas em meio MS + 30g/L de sacarose, fotoperíodo de 16h, T $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, idade de 60 dias; b) *in vivo*, em substrato vermiculita, em casa-de-vegetação, à T e luz ambientes, idade de 8 meses ($\text{---}1\text{cm}\text{---}$).

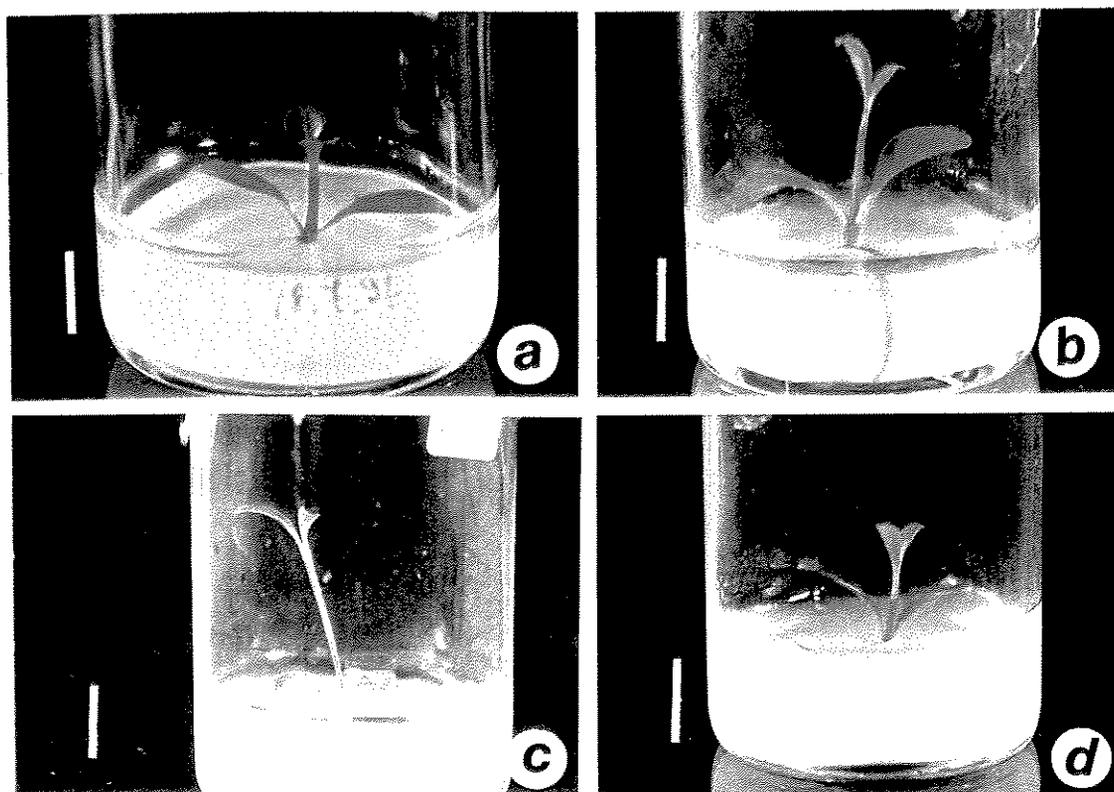


Figura 3: Aspecto de plantas de *C. nemorosa* desenvolvidas diretamente de submeristema apical: a) meio MS + 1,0mg/L BA e 0,1mg/L GA₃; b) meio MS + 0,1mg/L BA e 10,0mg/L GA₃; c) meio MS + 0,5mg/L BA e 10,0mg/L GA₃; d) meio MS + 0,5mg/L BA e 10,0mg/L GA₃. Câmara de crescimento à T 25°C ± 2°C. Fotoperíodos utilizados: a, b e c: 18h; d: 8h. Documentação após 30 dias de cultivo *in vitro* (—1cm—).

DISCUSSÃO

Os testes de germinação de sementes facilitaram a obtenção rápida de plantas jovens que, crescidas em casa-de-vegetação, serviram como fonte de explantes para a cultura de tecidos. Desta forma o material teve sua origem e idade fisiológica padronizadas para o cultivo *in vitro* e para os estudos posteriores de fotoperiodismo. A perda da resposta fotoblástica pelas sementes nuas talvez esteja relacionada ao fitocromo. O fitocromo V_e (F_{V_e}) aumenta o potencial de crescimento da radícula, quebrando a fotodormência. Quando as camadas que protegem o embrião (endosperma, testa e fruto) são retiradas, pequenas quantidades de luz vermelha são suficientes para induzir a germinação ($F_v \rightarrow F_{V_e}$), já que não há mais a restrição dos tecidos envolventes (SALISBURY, 1992).

Testes preliminares com material coletado no campo indicaram a necessidade de altas concentrações de agentes esterilizantes para desinfecção dos tecidos. Isto reduziu bastante a viabilidade dos explantes em cultura. A utilização de folíolos e de submeristemas de plantas crescidas em casa-de-vegetação diminuiu a necessidade de métodos mais agressivos de esterilização e assim aumentou a viabilidade dos explantes e a resposta aos tratamentos.

Para a obtenção de plantas *in vitro* a partir de submeristemas foi essencial a presença de citocinina no meio. A

aplicação de GA₃ promoveu o alongamento do caule, que foi proporcional à concentração da giberelina; este efeito já é conhecido em outras espécies (SALISBURY, 1994). Porém, as partes aéreas das plantas obtidas de submeristemas tiveram desenvolvimento lento, não tendo sido fonte preferencial de explantes para experimentos em cultura. De acordo com GOH et al. (1997) métodos eficientes de regeneração *in vitro* foram desenvolvidos para poucas espécies de plantas lenhosas, que são muito resistentes ao cultivo *in vitro*.

CONCLUSÃO

Os protocolos obtidos para o cultivo *in vitro*, padronizados para *C. nemorosa*, foram os seguintes:

I

1. Germinação de sementes nuas em condições de luz
2. Transferência das plantas jovens para casa-de-vegetação
3. Isolamento do par de folhas mais jovem
4. Esterilização com álcool e hipoclorito
5. Cultivo *in vitro* (Capítulo 2)

II

1. Esterilização de sementes nuas e germinação em meio de cultura em condições assépticas
2. Isolamento asséptico das raízes subterrâneas
3. Cultivo em meio líquido (Capítulo 2)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BITTRICH, V., 1995. Estudos Sistemáticos no Gênero *Clusia* L. (Guttiferae) no Brasil. IN: XLVI Congresso Nacional de Botânica, Ribeirão Preto, SP, Brasil, anais, p.3.
- BITTRICH, V., 1997 O gênero *Clusia* (Guttiferae) para a Floricultura. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental 3(1):13-19.
- BITTRICH, V. & AMARAL, M.C.E., 1996. Flower morphology and pollination biology of *Clusia* species from the Gran Sabana (Venezuela) Kew Bulletin 51(4): 681-694.
- BITTRICH, V. & AMARAL, M.C.E., 1997. Floral Biology of some *Clusia* species from Central Amazonia. Kew Bulletin 52(3): 617-635.
- CHEDIER, L.M., PAIVA, S.R., ROSAS, E.C., SAMPAIO, A.L.F., PEREIRA, D.E., HENRIQUES, M.G.M.O., FIGUEIREDO, M.R., KAPLAN, M.A.C., 1998^c. Estudo da atividade anti-inflamatória de *Clusia criuva* Cambess. IN: XV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Águas de Lindóia, resumos, p.62.
- CHEDIER, L.M., PAIVA, S.R., SOARES, R.O.A., FERNADEZ-FERREIRA, E., GIBALDI, D., STUTZ, C.M., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R., FIGUEIREDO, M.R., KAPLAN, M.A.C., 1998^b. Atividade antineoplásica "in vitro" de *Clusia criuva* Cambess. IN: XV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Águas de Lindóia, resumos, p.58.

- CHEDIER, L.M., PAIVA, S.R., SOARES, R.O.A., FERNADEZ-FERREIRA, E., GIBALDI, D., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FIGUEIREDO, M.R., KAPLAN, M.A.C., 1998^a. Avaliação da atividade tripanossomicida de *Clusia criuva* Cambess. IN: XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Águas de Lindóia, resumos, p.58.
- GONZÁLEZ, M.G. & MATAMOROS, O.M., 1996. Cardiovascular effects of leaf water extract in *Clusia coclensis* (Guttiferae). Revista de Biologia Tropical 44(1):87-91.
- GUSTAFSON, K.R., BLUNT, J.W., MUNRO, M.H.G., FULLER, R.W., MCKEE, T.C., CARDELLINA II, J.H., MCMAHON, J.B., CRAGG, G.M., BOYD, M.R., 1992. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. Tetrahedron 48:10093-10102.
- HOAGLAND, D.R., ARNON D.I., 1938. The water-culture method of growing plants without soil. Circular 347, University of California - Agricultural Experiment Station, Berkeley, 39p.
- MARSAIOLI, A.J., PORTO, A.L.M., GONÇALVES, A.C., OLIVEIRA, C. M. A. DE, MANFIO, G., BITTRICH, V., 1997. The ecosystem of microorganisms, bees and *Clusia* floral resins and oils from the chemistry point of view. IN: III Jornada Paulista de Plantas Medicinais, Campinas, SP, resumos, p.11-13.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15:473-497.

- MURASHIGE, T. & SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- OLIVEIRA, C.M.A. DE, PORTO, A.M., BITTRICH, V., VENCATO, I., MARSAIOLI, A.J., 1996. Floral resins of *Clusia* spp.: Chemical composition and biological function. *Tetrahedron Letters* 37(36): 6427-6430.
- ROBERTS, M.F., 1988. Medicinal Products through Plant Biotechnology IN: *Manipulating Secondary Metabolism in culture* (Robins & Rhodes, ed.), Cambridge University Press, Cambridge, p.201-216.
- SALISBURY, F.B., 1994. The Role of Plant Hormones IN: *Plant-Environment Interactions* (Wilkinson, R.E., ed.) Marcel Dekker, New York, p.39-81.
- SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W., 1992. *Plant Physiology*, 4th Ed., Wadsworth Publishing Company, Belmont, 682p.
- TOMÁS-BARBERÁN, F.A., GARCÍA-VIGUERA, C., VIT-OLIVIER, P., FERRERES, F., TOMÁS-LORENTE, F., 1993. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry* 34(1):191-196.

Capítulo 2

Cultivo *in vitro* de *Clusia nemorosa*, *Clusia grandiflora* e *Clusia spiritu-sanctensis*

II: Cultivo de raízes em meio líquido, cultivo de folhas: formação de calos e regeneração

INTRODUÇÃO

O gênero *Clusia* L. (Guttiferae) tem distribuição neotropical, com cerca de 250 espécies. O Brasil possui aproximadamente 60 espécies nativas, das quais algumas têm sido usadas no paisagismo (BITTRICH, 1997).

As espécies do gênero têm mostrado grande importância na produção de compostos com atividade farmacológica. OLIVEIRA et al. (1996) identificaram a presença de clusianonas, compostos da classe das benzofenonas, nas resinas florais de *C. nemorosa*, *C. rosea*, *C. grandiflora*, *C. insignis*, *C. spiritu-sanctensis* e *C. pernambucanensis*. Estes compostos têm atividade antimicrobiana (MARSAIOLI et al., 1997) e anti-HIV (GUSTAFSON et al., 1992).

Células vegetais cultivadas *in vitro* podem ser utilizadas para a produção de metabólitos secundários (SHEPHERD, 1995). O potencial de culturas de células vegetais na produção desses compostos tem estado sob intensa investigação e tem se mostrado útil não só na obtenção dos compostos secundários, mas também na

elucidação de vias metabólicas (ROBERTS, 1988). O cultivo *in vitro* de jatobá (*Hymenaea courbaril*) permitiu a obtenção de terpenos, compostos presentes na resina secretada por células epidermais da planta *in vivo* em resposta a uma injúria (SIEWERT *et al.*, 1995).

A cultura de raízes também apresenta um grande potencial na produção de metabólitos de interesse (FLORES & CURTIS, 1992). Podem ser mencionadas, por exemplo, a cultura de raízes intactas de *Hyosciamus niger* que produzem a escopolamina (WOO *et al.*, 1995) e a cultura de raízes transformadas do híbrido *Fragaria x Ananassa* que produzem polifenóis (MOTOMORI *et al.*, 1995).

A manutenção de culturas *in vitro* se dá graças ao fornecimento de nutrientes necessários ao crescimento e desenvolvimento dos tecidos. Cada meio de cultura possui um conjunto padrão de nutrientes: sais, vitaminas, fontes de carbono, capazes de dar as condições mínimas para que o tecido se desenvolva, além das combinações de fitorreguladores que são capazes de promover as mais diferentes respostas. Cada espécie ou variedade vegetal apresenta exigências mínimas de cultivo *in vitro*, por isso para cada material é necessário o desenvolvimetro de um protocolo de cultivo específico onde as exigências nutricionais e hormonais sejam supridas.

Não há registro em literatura de cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Clusia*. Espécies de outros gêneros de Guttiferae foram estabelecidas *in vitro*, entre elas *Hypericum*

brasiliense (CARDOSO & OLIVEIRA, 1996), *Kielmeyera coriacea* (ARELLO, 1991) e *Garcinia mangostana* (GOH et al., 1994; 1997).

O objetivo deste trabalho foi:

- estabelecer protocolos de cultivo *in vitro* de *Clusia* L. para: a) obtenção de calos a partir de explantes foliares; b) crescimento de raízes em meio líquido.

O comportamento *in vitro* de *C. nemorosa* G. Mey, *C. grandiflora* Splitg. e *C. spiritu-sanctensis* G. Mariz & B. Weinberg foi estudado.

MATERIAL E MÉTODOS

Estabelecimento de protocolo padrão para formação de calo

Obtenção de explantes

Folhas jovens (não expandidas) de plantas de *C. nemorosa*, *C. grandiflora* e *C. spiritu-sanctensis* com 6-9 semanas de idade, germinadas conforme descrito no experimento de germinação do Capítulo 1 e mantidas em casa-de-vegetação, serviram como fonte de explantes. A obtenção de explantes foi feita a partir da excisão de folíolos apicais com auxílio de estilete. Estes foram esterilizados conforme os procedimentos desenvolvidos no capítulo 1: Álcool 70% (v/v) por 10s, enxágue com água destilada autoclavada seguida por solução de Hipoclorito de Sódio 15% (v/v) com 2 gotas de Tween 20 para 100ml durante 12min e enxágue por mais 4 vezes com água destilada. Segmentos de aproximadamente 1cm x 1cm foram cortados das folhas após a retirada do pecíolo e das bordas foliares. Os explantes assim obtidos foram enxutos em papel de filtro e transferidos para os meios de cultura. Todo o processo iniciado com a esterilização das folhas foi feito em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar (VECO HLFS 12).

Preparação do meio básico

O meio básico utilizado nos experimentos foi o $\frac{1}{2}$ MS (metade da concentração de macronutrientes do meio MS, MURASHIGE & SKOOG,

1962), acrescido de 30g/L de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH e HCl (1N) após o acréscimo dos fitorreguladores e só então o ágar foi colocado na concentração de 1% (p/v). Os meios foram autoclavados por 20min à temperatura de 121°C e distribuídos em placas de petri (9,0cm de Ø), 40ml cada.

Preparação dos meios com combinações de fitorreguladores

Os meios foram preparados com concentrações combinadas de auxina (ANA ou 2,4-D) e citocinina (BA ou KIN) resultando em 10 experimentos apresentados na Tabela 1.

As condições experimentais para formação de calo foram escuro total e temperatura de 25°C ± 2°C. Quando houve desenvolvimento de partes aéreas, os explantes foram transferidos para condição de 18h de luz.

Tabela 1: Esquema dos experimentos realizados para formação de calo e regeneração das espécies do gênero *Clusia*: *C. nemorosa* (C3), *C. grandiflora* (C8) e *C. spiritus-sanctensis* (C9).

Experimento (n°)	Espécie	Combinções hormonais		N° de tratamentos	N° de explantes	Mês
		Auxina [] mg/L	Citocinina [] mg/L			
1	C3	ANA 0,5; 1,0; 2,0	BA 0,5; 1,0; 2,0; 5,0	12	3	Setembro
2	C3	ANA 0,5; 1,0; 2,0	BA 0,5; 0,1; 1,0; 2,0; 5,0	15	6	Janeiro
3	C3	2,4-D 0,1; 0,5; 1,0	BA 1,0; 1,5; 2,0	9	5	Março
4	C3	2,4-D 0,1; 0,5; 1,0	BA 1,0; 1,5; 2,0	9	6	Março
5	C3	2,4-D 0,05; 0,1 ANA 3,0	BA 1,0; 1,5; 2,0	9	6	Julho
6	C8	2,4-D 0,1; 0,5; 1,0	BA 1,0; 1,5; 2,0	9	6	Agosto
7	C8	ANA 3,0	BA 1,5; 5,0 KIN 5,0	3	5	Agosto
8	C3	ANA 3,0	BA 1,5; 5,0 KIN 5,0	3	6	Agosto
9	C8	2,4-D 0,1; 0,5 ANA 3,0	BA 1,0; 1,5	6	12	julho
10	C9	ANA 0,5; 1,0; 2,0	BA 0,5; 1,0; 2,0; 5,0	12	5	Março

Avaliação dos resultados

O desenvolvimento do calo foi avaliado após 30 dias em cultura quando também foi feita a caracterização com base na morfologia (aparência, cor, presença ou ausência de exsudatos). A regeneração de caules e raízes e a produção de exsudatos foi verificada após 90 dias.

Estudo do crescimento de raízes *in vitro*

O desenvolvimento de raízes a partir de segmentos radiculares (raízes subterrâneas) foi testado com os seguintes meios: B5 (GAMBORG et al. 1968), MS e ½ MS. Cada meio foi testado com as seguintes concentrações de fitorreguladores: 2,0mg/L de ANA; 2,0mg/L ANA + 1,0mg/L BA ou sem fitorreguladores. O pH foi ajustado para 5,8 e os meios foram distribuídos em erlenmeyers de 250ml, 100ml por frasco e foram autoclavados a 121°C por 20min.

Raízes de plantas de *C. nemorosa* de 60 dias crescendo *in vitro* foram isoladas em condições assépticas. Padronizaram-se segmentos de raiz de 2-3cm sem o meristema apical para verificar o desenvolvimento de raízes laterais. Estes segmentos foram colocados nos meios líquidos descritos acima e foram mantidos em agitador orbital (New Brünswick, USA) sob rotação de 80 rpm com temperatura controlada de 25°C ± 1°C e luz contínua fornecida externamente (incandescente PHILIPS de 60W). A avaliação do crescimento radicular foi feita após 90 dias de cultivo.

Crescimento do calo em meio padrão

O monitoramento do calo de *C. nemorosa* e de *C. grandiflora* foi feito depois de estabelecida uma combinação hormonal capaz de levar à formação do mesmo.

Os explantes foliares foram esterilizados como estabelecido no Capítulo 1. Os explantes foram cortados da região proximal ao pecíolo das folhas, contendo metade da nervura primária, em tamanho padronizado de 1,5cm x 0,5cm num total de 10 explantes de cada espécie. As medidas da massa fresca de cada explante foram feitas antes de estes serem colocados no meio definitivo: meio básico acrescido de 0,1mg/L 2,4-D e 1,0mg/L BA. O crescimento dos calos foi monitorado *in vitro* através da massa fresca do explante que foi medida a intervalos de 4-5 dias durante 40 dias. Os explantes foram recolocados no meio de cultura após cada pesagem, em condições assépticas.

RESULTADOS

Formação de calos em combinações hormonais

Os calos foram classificados em 7 grupos em função de características que apresentaram ao final de 30 dias de inoculação em meio de cultura:

A: Esponjoso, branco, pequeno, em resposta ao corte

B: Esponjoso, branco, grande, diferenciado

C: Compacto, cor creme, sem exsudar

D: Compacto, cor creme, produzindo exsudato

E: Amorfo, escuro, sem exsudar

F: Amorfo, escuro, produzindo exsudato

Os calos de maior interesse são os que secretam substâncias, D e F, pois podem ser potencialmente fonte de compostos com atividade biológica. No entanto, os calos com esta característica são também extremamente duros. Os calos brancos, esponjosos e sem exsudato têm uma aparência menos compacta, com partes friáveis e através de seleção contínua podem se constituir no início do estabelecimento de cultura de células em suspensão com a finalidade de elucidar vias biossintéticas.

C. nemorosa

Os experimentos 1, 2 e 8 com BA x ANA (Tabela 1) resultaram em calos em sua maioria das classes C, E e F e em menor proporção, da classe D (Tabela 2). Destes, os calos das classes D

e F se caracterizam por produzir exsudato, o calo da classe F o faz mesmo estando oxidado. Todos os tratamentos dos experimentos 1 e 2 levaram à formação de pelo menos 20% de calos que produzem exsudatos (fig. 1). Foi maior a quantidade de exsudato produzido pelos calos nas combinações de 1,0mg/L ANA x 5,0mg/L BA e 2,0mg/L ANA x 2,0mg/L BA. A produção de exsudato parece estar relacionada com um equilíbrio nas concentrações ANA/BA (mg/L): 0,5/1,0; 1,0/2,0 e 2,0/2,0. A oxidação (escurecimento) do calo está relacionada com as baixas concentrações de auxina (ANA), todas as combinações cuja concentração de ANA foi de 0,5mg/L apresentaram mais de 60% dos calos oxidados (classes E e F), independente da concentração de BA: 1,0, 1,5 ou 2,0mg/L (fig. 1). No experimento 5, no qual a concentração de ANA foi de 3,0mg/L, não houve problema com oxidação e sim formação de calos das classes A, B e C (fig. 2) independente da concentração de BA. Este resultado confirma a hipótese de que maiores concentrações de ANA evitam a oxidação do calo.

Os experimentos 3, 4 e 5 (Tabela 1) permitiram a formação de calo em todas as combinações de 2,4-D e BA testadas (fig. 3). Os calos formados sob influência destes fitorreguladores pertencem principalmente às classes A e B (Tabela 3, fig. 4). Nestes experimentos, o meio com 0,1mg/L 2,4-D x 1,0mg/L formou um calo da classe A que exsudou após 120 dias em cultura (Fig. 4). A formação de calos da classe B foi promovida por baixas concentrações hormonais, estando principalmente relacionada à

auxina, na concentração de 0,1mg/L. O meio com concentração de 1,0mg/L 2,4-D e 1,0mg/L BA foi o que apresentou o calo com melhor aparência e o meio 0,1mg/L 2,4-D x 2,0mg/L BA foi o que apresentou maior porcentagem de formação de calos da classe B (fig. 3).

Tabela 2: Caracterização dos calos de *C. nemorosa* em função da combinação de ANA e BA; gradiente de concentração em mg/L, após 30 dias de cultivo no escuro, à T 25°C ± 2°C. As letras referem-se a características presentes em pelo menos 50% do total dos calos crescidos naquela combinação hormonal.

A: Esponjoso, branco, pequeno, em resposta ao corte

B: Esponjoso, branco, grande, diferenciado

C: Compacto, cor creme, sem exsudar

D: Compacto, cor creme, produzindo exsudato

E: Amorfo, escuro, sem exsudar

F: Amorfo, escuro, produzindo exsudato

	ANA	0,5	1,0	2,0
BA		(2,69µM)	(5,37µM)	(10,74µM)
0,5 (2,22µM)		E	C	E
1,0 (4,44µM)		F	C	E
2,0 (8,88µM)		E	F	D
5,0 (22,20µM)		E	C	C

Tabela 3: Caracterização dos calos de *C. nemorosa* em função da combinação de 2,4-D e BA; gradiente de concentração em mg/L, após 30 dias de cultivo no escuro, à T 25°C ± 2°C. As letras referem-se a características presentes em pelo menos 50% do total dos calos crescidos naquela combinação hormonal.

A: Esponjoso, branco, pequeno, em resposta ao corte

B: Esponjoso, branco, grande, diferenciado

C: Compacto, cor creme, sem exsudar

D: Compacto, cor creme, produzindo exsudato

E: Amorfo, escuro, sem exsudar

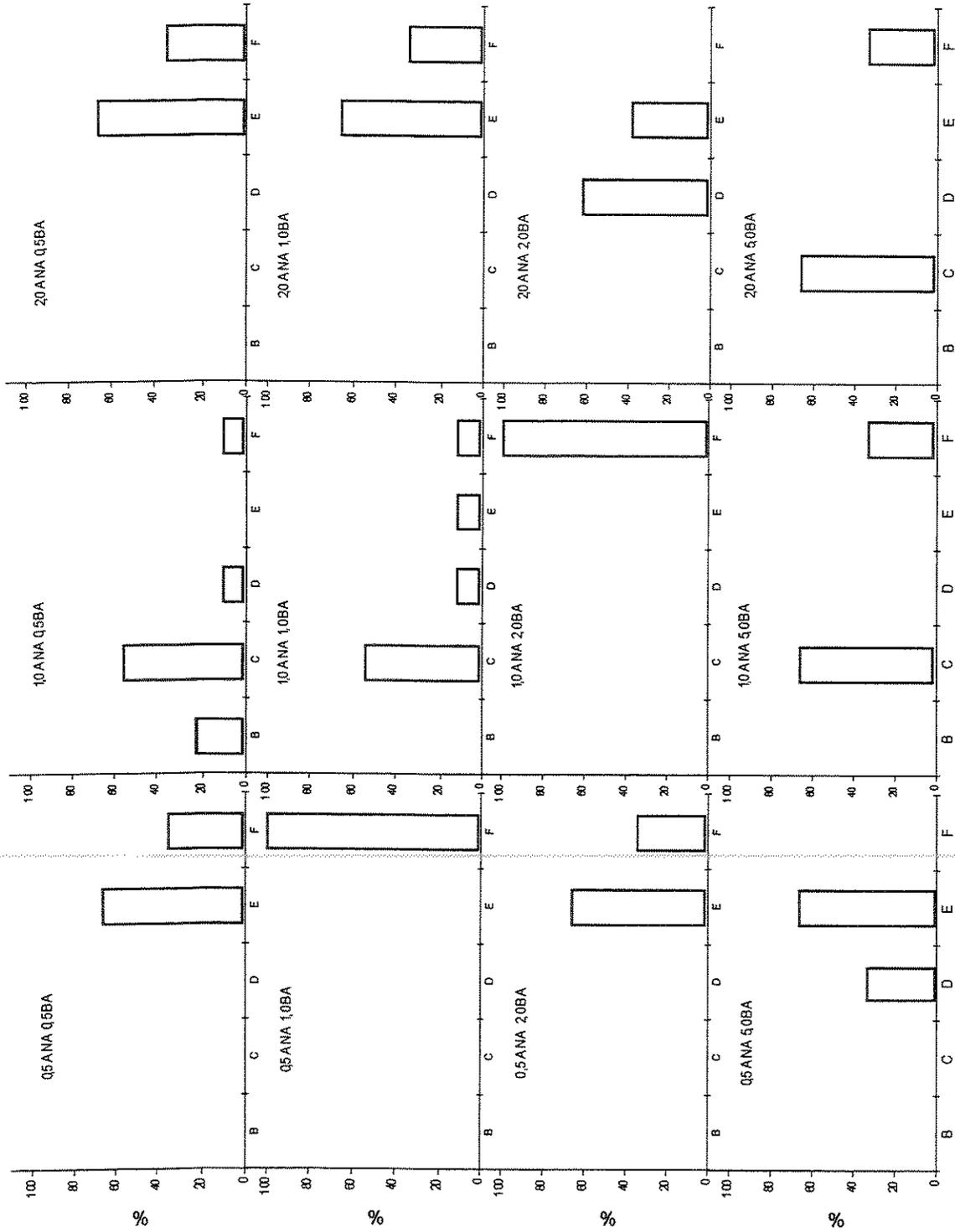
F: Amorfo, escuro, produzindo exsudato

	2,4-D	0,05	0,1	0,5	1,0
BA		(0,226µM)	(0,452µM)	(2,26µM)	(4,52µM)
1,0 (4,44µM)		A	B	B	A
1,5 (6,66µM)		A	B	C	A
2,0 (8,88µM)		A/B	B	A	A

Figura 1: Calos obtidos de explantes foliares de *C. nemorosa* mantidos em combinações de ANA x BA, concentrações em mg/L (experimentos 1 e 2) após 30 dias no escuro à T 25°C ± 2°C.

Distribuição em classes morfológicas:

- A:** Esponjoso, branco, pequeno, em resposta ao corte
- B:** Esponjoso, branco, grande, diferenciado
- C:** Compacto, cor creme, sem exsudar
- D:** Compacto, cor creme, produzindo exsudato
- E:** Amorfo, escuro, sem exsudar
- F:** Amorfo, escuro, produzindo exsudato



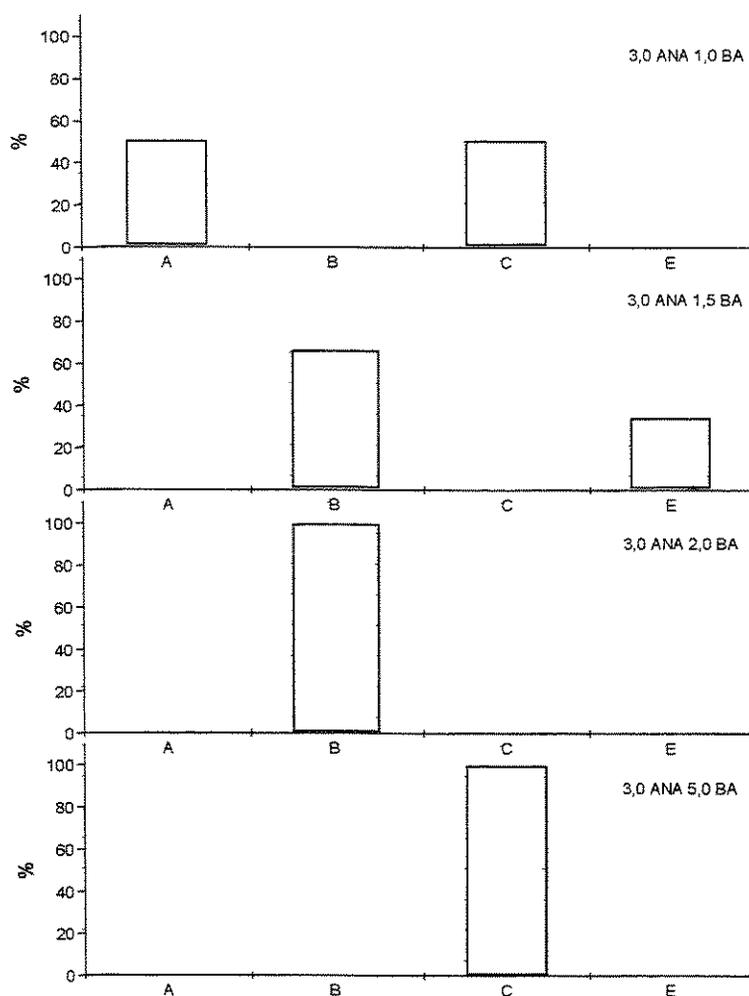


Figura 2: Calos obtidos de explantes foliares de *C. nemorosa* mantidos em combinações de ANA x BA, concentrações em mg/L (experimentos 5 e 8) após 30 dias no escuro à T $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

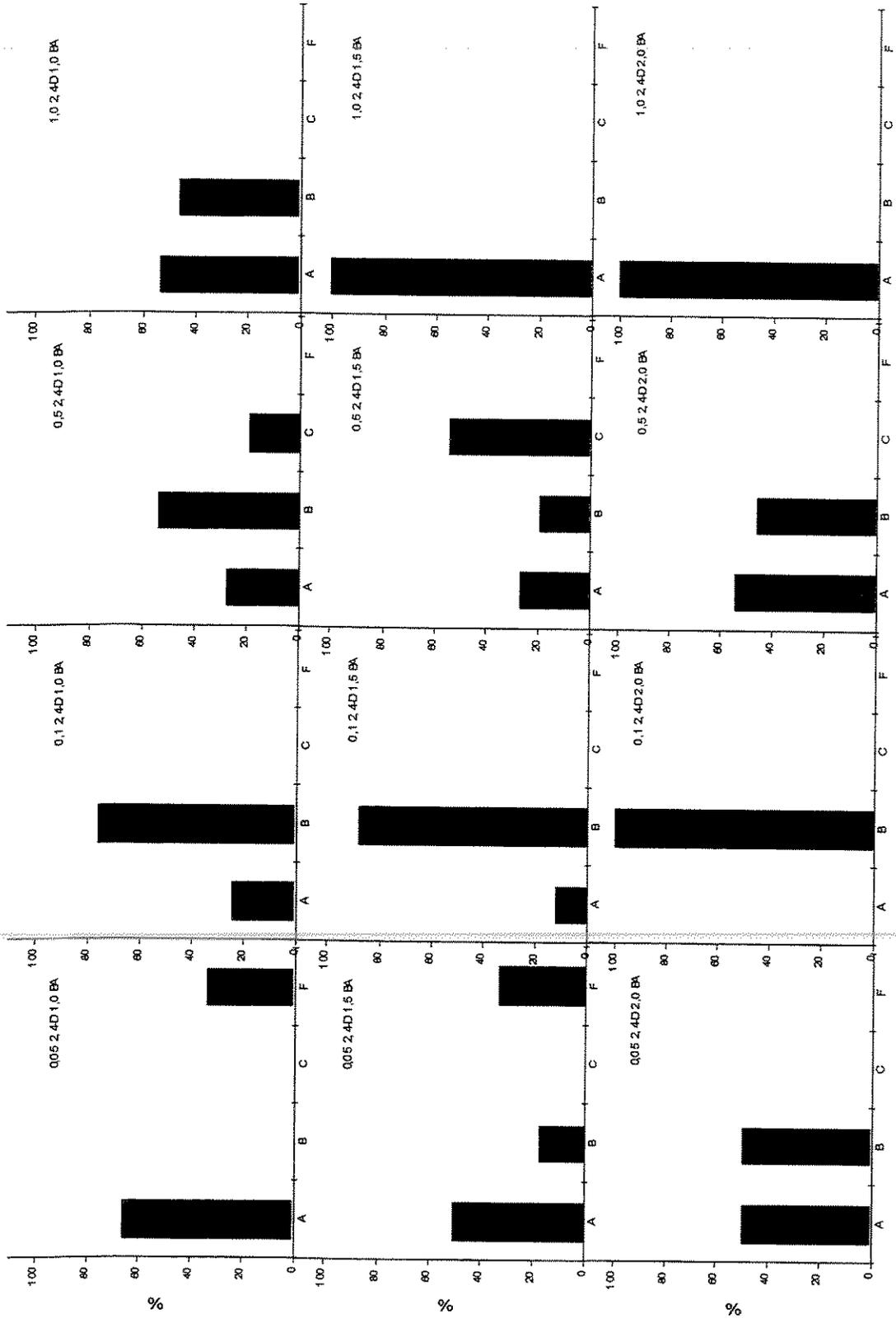
Distribuição em classes morfológicas:

- A: Esponjoso, branco, pequeno, em resposta ao corte
- B: Esponjoso, branco, grande, diferenciado
- C: Compacto, cor creme, sem exsudar
- D: Compacto, cor creme, produzindo exsudato
- E: Amorfo, escuro, sem exsudar
- F: Amorfo, escuro, produzindo exsudato

Figura 3: Calos obtidos de explantes foliares de *C. nemorosa* em combinações de 2,4-D x BA, concentrações em mg/L (experimentos 3, 4 e 5) em meio $\frac{1}{2}$ MS, após 30 dias no escuro, T 25°C \pm 2°C.

Distribuição em classes morfológicas:

- A: Esponjoso, branco, pequeno, em resposta ao corte
- B: Esponjoso, branco, grande, diferenciado
- C: Compacto, cor creme, sem exsudar
- D: Compacto, cor creme, produzindo exsudato
- E: Amorfo, escuro, sem exsudar
- F: Amorfo, escuro, produzindo exsudato



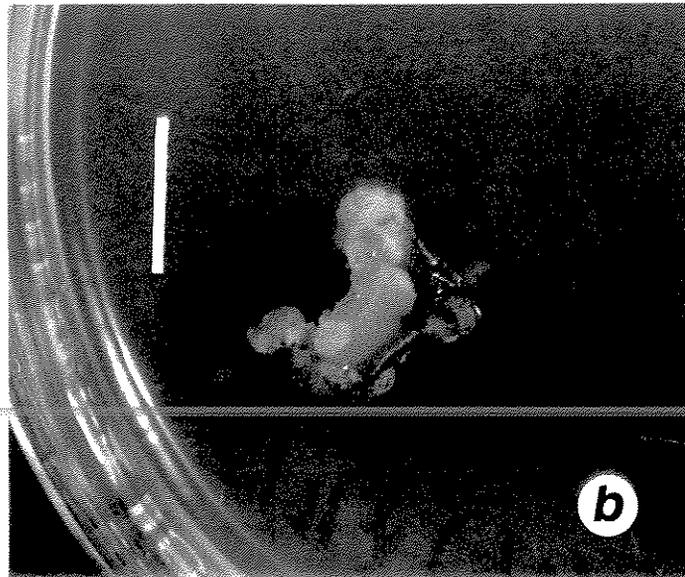
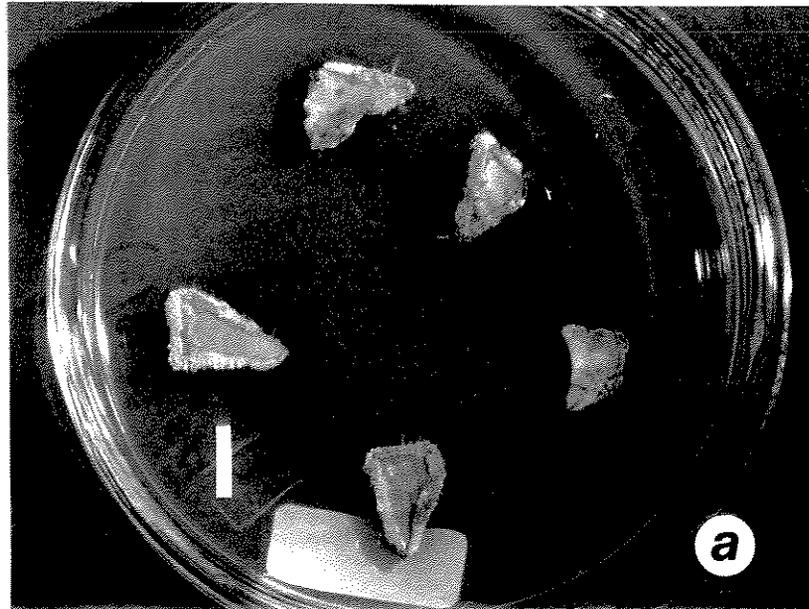


Figura 4: Calos de *Clusia nemorosa* em meio $\frac{1}{2}$ MS: a) classe A, 1,0mg/L 2,4-D x 1,5mg/L BA; b) classe B, meio $\frac{1}{2}$ MS com 0,1mg/L 2,4-D x 1,0mg/L BA, produzindo exsudato (120 dias). Cultivo no escuro à T $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ($\text{---}1\text{cm}\text{---}$).

C. grandiflora

Os experimentos 6 e 7 (Tabela 1), com *C. grandiflora*, resultaram na formação de calos principalmente das classes A, B e E, mas também das classes C e F (Tabela 4, fig. 5). O meio contendo 0,5mg/L 2,4-D x 2,0mg/L BA foi o que apresentou a maior porcentagem de formação de calos da classe B. O experimento 9, com concentração de 3,0mg/L ANA, resultou em formação exclusiva de calos da classe C independente da concentração de BA (fig. 5). O experimento 7, confrontando a ação de BA e KIN, levou à formação de calos da classe B na concentração de 3,0mg/L ANA x 5,0mg/L KIN; estes estavam ainda grandes e viáveis após 120 dias (fig. 6a).

A combinação hormonal de 2,4-D e BA levou à regeneração direta de partes aéreas via organogênese de explantes foliares de *C. grandiflora*. Partes aéreas foram regeneradas diretamente em dois explantes, mantidos em 0,1mg/L 2,4-D x 1,5mg/L BA (5 partes aéreas) e em 0,5mg/L 2,4-D x 1,5mg/L BA (1 parte aérea) (fig. 6b). Também ocorreu a diferenciação de raízes, resultado comum para as espécies de *Clusia* testadas. A formação de raiz conectada a uma parte aérea regenerada permitiu o isolamento de uma planta completa que foi transferida para meio básico ($\frac{1}{2}$ MS + 30g/L de sacarose) onde continuou se desenvolvendo (fig. 6c) em condições de 18h de luz e T 25°C \pm 2°C.

Tabela 4: Caracterização dos calos de *C. grandiflora* em função da combinação de 2,4-D e BA; gradiente de concentração em mg/L, após 30 dias de cultivo no escuro, à T 25°C ± 2°C. As letras referem-se a características presentes em pelo menos 50% do total dos calos crescidos naquela combinação hormonal.

A: Esponjoso, branco, pequeno, em resposta ao corte

B: Esponjoso, branco, grande, diferenciado

C: Compacto, cor creme, sem exsudar

D: Compacto, cor creme, produzindo exsudato

E: Amorfo, escuro, sem exsudar

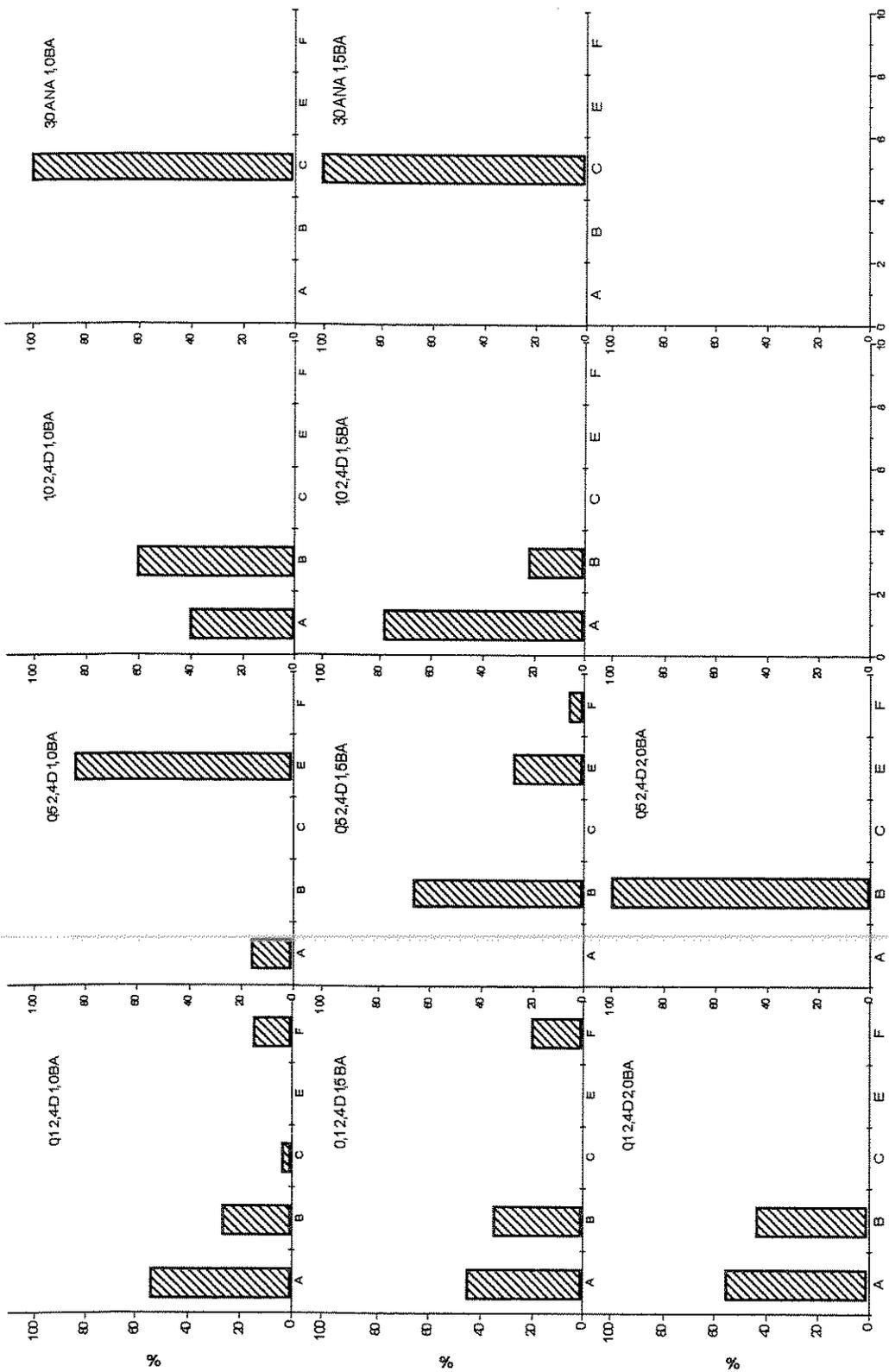
F: Amorfo, escuro, produzindo exsudato

	2,4-D	0,1	0,5	1,0
BA		(0,452µM)	(2,26µM)	(4,52µM)
1,0 (4,44µM)		A	E	B
1,5 (6,66µM)		A	B	A
2,0 (8,88µM)		A	B	-

Figura 5: Calos obtidos de explantes foliares de *C. grandiflora* em combinações de 2,4-D x BA e ANA x BA (experimentos 6, 7 e 9, concentrações em mg/L) em $\frac{1}{2}$ MS, 30 dias no escuro, T 25°C \pm 2°C.

Distribuição em classes morfológicas:

- A: Esponjoso, branco, pequeno, em resposta ao corte
- B: Esponjoso, branco, grande, diferenciado
- C: Compacto, cor creme, sem exsudar
- D: Compacto, cor creme, produzindo exsudato
- E: Amorfo, escuro, sem exsudar
- F: Amorfo, escuro, produzindo exsudato



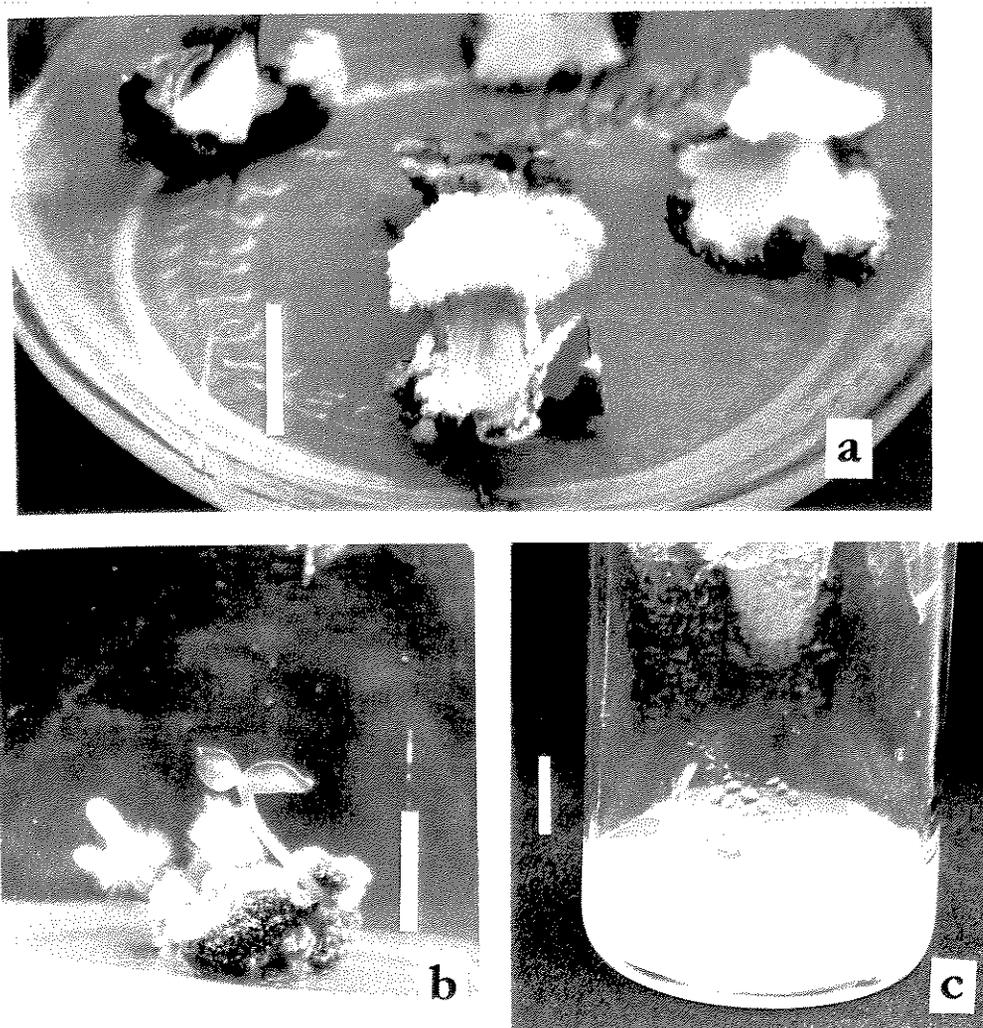


Figura 6: Resposta de *C. grandiflora* em meio de cultura. a) calo da classe A, 3,0mg/L ANA x 5,0mg/L KIN; b) calo com regeneração de parte aérea e raízes, 0,5mg/L 2,4-D x 1,5mg/L BA, 3 meses; c) planta regenerada de meio 0,5mg/L 2,4-D x 1,5mg/L BA e isolada em meio básico, mantida em 18h de luz a T 25°C \pm 2°C (—1cm—).

C. spiritu-sanctensis

Os explantes foliares desta espécie não responderam ao padrão de protocolo desenvolvido para *C. nemorosa*, no período de 30 dias a 60 dias. Estudos com outras condições de cultivo *in vitro* devem ser desenvolvidos especificamente para *C. spiritu-sanctensis*

Monitoramento *in vitro* de calos de *C. nemorosa* e *C. grandiflora* em meio padrão (meio ½ MS com 0,1mg/L 2,4-D e 1,0mg/L BA)

Ao final de 40 dias em cultura houve um aumento na massa fresca sobre a massa inicial dos explantes de 92,3% em *C. nemorosa* e de 290,6% em *C. grandiflora*. Os valores de massa fresca são mostrados na Tabela 5. A curva de crescimento da figura 7 indica que com 40 dias os calos ainda estão no início da fase de crescimento, particularmente na espécie *C. nemorosa*, dado confirmado por acompanhamento posterior (dado não apresentado)

Tabela 5: Aumento da massa fresca do calo de *C. nemorosa* e *C. grandiflora*, após a 40 dias em cultura (Δ_f) em meio padrão $\frac{1}{2}$ MS, 0,1mg/L 2,4-D e 1,0mg/L BA, no escuro, à T. 25°C \pm 2°C. Média de 10 explantes \pm d.p.

Espécie	Δ_{inicial} (g)	Δ_{final} (g)	$\Delta_f - \Delta_0$ (g)	%
<i>C. nemorosa</i>	0,039 \pm 0,005	0,075 \pm 0,01	0,036 \pm 0,008	92,3
<i>C. grandiflora</i>	0,032 \pm 0,007	0,127 \pm 0,05	0,093 \pm 0,043	290,6

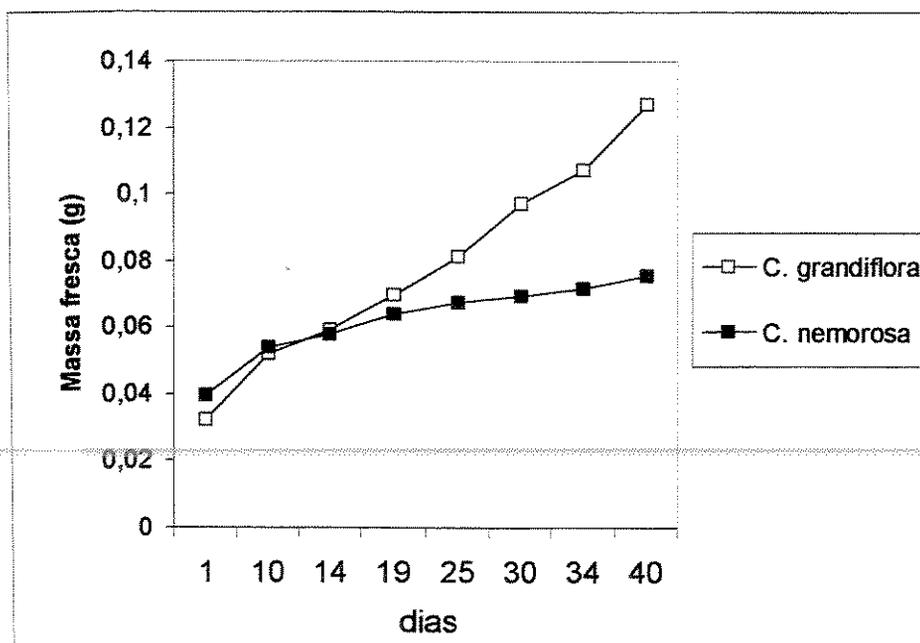


Figura 7: Acúmulo de massa fresca em explantes de *C. nemorosa* e *C. grandiflora* devido à formação de calo, em meio indutor com 0,1mg/L 2,4-D e 1,0mg/L BA, ao longo de 40 dias, média de 10 explantes. Condições de cultivo: escuro e T 25°C \pm 2°C.

Cultura de raízes em meio líquido.

O resultado do crescimento de raízes em meio líquido foi influenciado pela interação entre o meio utilizado e a concentração de fitorreguladores (fig. 8).

Ausência de fitorreguladores no meio

A ausência de fitorreguladores impediu o crescimento total de raízes nos meios B5 e MS. Ocorreu o crescimento de raízes laterais em 20% dos explantes em $\frac{1}{2}$ MS nesta condição.

Concentração de 2,0mg/L de ANA

Em meio B5, 100% dos explantes desenvolveram raízes laterais, sendo este o melhor resultado do experimento. Houve desenvolvimento de raízes laterais em 50% dos explantes em meio $\frac{1}{2}$ MS e também houve formação de calo, em 60% do total de explantes. Resultado semelhante foi obtido em meio MS, com desenvolvimento de raízes laterais em apenas 40% dos explantes.

Combinação de 2,0mg/L ANA e 1,0mg/L BA

Esta combinação levou à formação de calo nos explantes de todos os tratamentos e a um escurecimento do meio em função de oxidação. Apenas os explantes em meio $\frac{1}{2}$ MS foram favorecidos por esta combinação, com formação de raízes laterais em 40% do total de explantes.

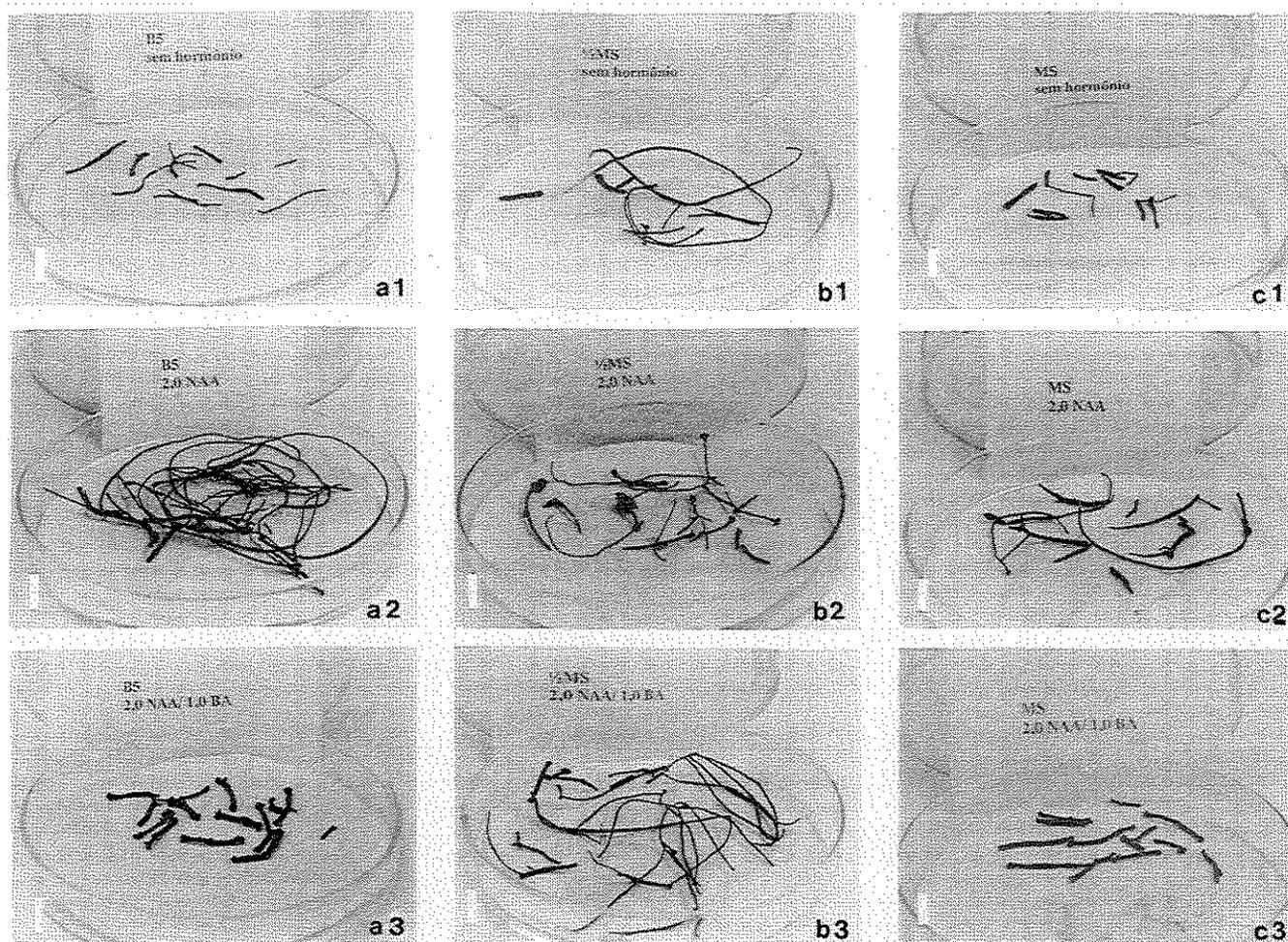


Figura 8: Crescimento de raízes de *C. nemorosa* em diferentes meios de cultura e concentrações de fitorreguladores. Colunas: a) B5; b) $\frac{1}{2}$ MS; c) MS. Linhas: 1) sem fitorreguladores; 2) com 2,0mg/L ANA; 3) com 2,0mg/L ANA e 1,0mg/L BA. Condições de cultivo: agitador orbital a 80 rpm sob luz contínua ($\text{---}1\text{cm}$).

DISCUSSÃO

C. grandiflora responde melhor ao cultivo *in vitro*, formando calos maiores e em menos tempo que *C. nemorosa*. *C. spiritus-sanctensis* não respondeu aos tratamentos, no período testado. As duas primeiras espécies pertencem à Seção *Chlamydoclusia* enquanto *C. spiritus-sanctensis* pertence à Seção *Cordylandra*. Estes resultados confirmam a necessidade de testar meios de cultura específicos para cada espécie ou variedade de planta.

C. grandiflora e *C. nemorosa* formaram calo em resposta aos tratamentos hormonais e ambas são dependentes de auxina e citocinina, de acordo com a classificação de Yeoman (CALDAS et al., 1990). Os resultados do experimento para formação de calos de *C. nemorosa* e *C. grandiflora* permitiram a escolha da combinação ideal de fitorreguladores para a obtenção do calo de interesse (produzindo exsudato ou friável). Meios com ANA estimularam a formação de calos com exsudato, embora muitas vezes oxidados. Mesmo escurecidos estes calos têm potencial para produzir compostos de interesse, como os terpenos produzidos por calos oxidados de *Aspidosperma ramiflorum* (Arildo J. B. Oliveira, comunicação pessoal). Análises preliminares do exsudato produzido por calos de *C. nemorosa* em CG/Massa (Cromatografia Gasosa/Espectrometria de massa) indicam a presença de compostos terpênicos (sesqui e tri-terpenos, dados não apresentados). Meios com baixas concentrações de 2,4-D levaram à formação de calos

mais homogêneos, esponjosos e brancos de grande potencial para o estabelecimento de cultura de células em suspensão. A eficiência do 2,4-D na calogênese de *Clusia* L. confirma o fato deste composto ser a auxina sintética mais comumente usada na indução de calo, sendo chamada "hormônio da desdiferenciação" (ENDREß, 1994).

A regeneração de partes aéreas em *C. grandiflora* ocorreu independente da formação de calo (regeneração direta) e fora da região da nervura. Observações semelhantes foram feitas em *Garcinia mangostana* e parecem confirmar o fato de que células capazes de formar calo e de regenerar não estão restritas à região da nervura; células de outras partes do explante seriam capazes também de regenerar partes aéreas (GOH et al., 1997).

O meio ideal para o crescimento de raízes de *C. nemorosa*, sem formação de calo, foi o B5 com 2,0mg/L ANA; este resultado está de acordo com a ação comprovada das auxinas na formação de raízes adventícias (SALISBURY, 1994).

CONCLUSÃO

C. nemorosa e *C. grandiflora* responderam aos tratamentos hormonais de forma diferente. Cada espécie respondeu a uma combinação hormonal, formando dois tipos de calos: calo branco friável e calo com exsudato. *C. spiritu-sanctensis* não apresentou resposta a estes tratamentos.

C. nemorosa formou preferencialmente calos brancos e friáveis em meio básico ($\frac{1}{2}$ MS) com 0,1mg/L 2,4-D x 2,0mg/L BA e 3,0mg/L ANA x 2,0mg/L BA e calos com exsudato em meio básico com 1,0mg/L ANA x 2,0mg/L BA (oxidados) e 2,0mg/L ANA x 2,0mg/L BA (creme).

C. grandiflora formou calos brancos e friáveis em meio básico complementado com 0,5mg/L 2,4-D x 2,0mg/L BA e calos com exsudato em meio básico com 0,1mg/L 2,4-D x 1,5mg/L BA. Excepcionalmente, partes aéreas foram regeneradas de folhas de *C. grandiflora* em meio básico com 0,1mg/L 2,4-D x 1,5mg/L BA e 0,5mg/L 2,4-D x 1,5mg/L BA.

O meio B5 complementado com 2,0mg/L ANA foi o meio líquido que mais favoreceu o crescimento de raízes de *C. nemorosa*, sem formação de calo.

A potencialidade do cultivo de *Clusia in vitro* deve ser aproveitada posteriormente na elaboração de experimentos com monitoramento químico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARELLO, E.F., 1991. Aspectos gerais do comportamento *in vitro* de *Kielmeyera coriacea* Martius (Guttiferae): Produção e enraizamento de brotações. Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil, tese de Mestrado.
- BITTRICH, V., 1997. O gênero *Clusia* (Guttiferae) para a Floricultura. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental 3(1):13-19.
- CALDAS, L.S., HARIDASAN, P., FERREIRA, M.E., 1990. Meios nutritivos. IN: Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas (A.C. Torres & L.S. Caldas, ed.), ABCT/EMBRAPA, Brasília, p.37-70.
- CARDOSO, M.A. & OLIVEIRA, D.E. DE., 1996. Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: Shoot multiplication and callus induction. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44:91-94.
- ENDREß, R., 1994. Plant Cell Biotechnology. Springer-Verlag, Berlin, 353p.
- FLORES, H.E. & CURTIS, W.R., 1992. Approaches to Understanding and Manipulating the Biosynthetic Potential of Plant Roots. Ann. NY Academy of Science 665:188-209.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exptl. Cell Res. 50:151-158.

- GOH, C.J., PRAKASH, L., LOH, C.S., 1994. High frequency direct shoot bud regeneration from excised leaves of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Plant Sci.* 68:173-180.
- GOH, C.J., NG, S.K., PRAKASH, L., LOH, C.S., 1997. The role of ethylene on direct shoot bud regeneration from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) leaves cultured in vitro. *Plant Sci.* 124:193-202.
- GUSTAFSON, K.R., BLUNT, J.W., MUNRO, M.H.G., FULLER, R.W., MCKEE, T.C., CARDELLINA II, J.H., MCMAHON, J.B., CRAGG, G.M., BOYD, M.R., 1992. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. *Tetrahedron* 48:10093-10102.
- MARSAIOLI, A.J., PORTO, A.L.M., GONÇALVES, A.C., OLIVEIRA, C. M. A. DE, MANFIO, G., BITTRICH, V., 1997 The ecosystem of microorganisms, bees and *Clusia* floral resins and oils from the chemistry point of view. IN: III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, Campinas, SP, resumos, p.11-13.
- MOTOMORI, Y., SHIMOMURA, K., MORI K., KUNITAKE, H., NAKASHIMA, T., TANAKA, M., MIYAZAKI, S., ISHIMARU, K., 1995. Polyphenol Production in Hairy Root Cultures of *Fragaria* X *Ananassa*. *Phytochemistry* 40(5):1425-1428.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.

- OLIVEIRA, C.M.A. DE, PORTO A.M., BITTRICH, V., VENCATO I., MARSAIOLI, A.J., 1996. Floral resins of *Clusia* spp.: Chemical composition and biological function. *Tetrahedron Letters* 37(36): 6427-6430.
- ROBERTS, M.F., 1988. Medicinal Products through Plant Biotechnology IN: Manipulating Secondary Metabolism in culture (Robins & Rhodes, ed.), Cambridge University Press, Cambridge, p.201-216.
- SALISBURY, F.B., 1994. The Role of Plant Hormones IN: Plant-Environment Interactions (Wilkinson, R.E., ed.) Marcel Dekker, New York, p.39-81.
- SHEPHERD, S.L.K., 1995. O Jardim Secreto das Plantas: Metabólitos secundários podem ser obtidos a partir de células cultivadas. *Ciência Hoje* 19(109):59-62.
- SIEWERT, A.C.C., IMAMURA, P.M., SHEPHERD, S.L.K., 1995. Terpenos produzidos por calos de jatobá (*Hymenaea courbaril* var. *Stilbocarpa* [Hayne] Lee & Langenheim). *Anais do IX Congresso da SBSP*, p.57-60.
- WOO, S.H., PARK, J.M., YANG, J., 1995. Production of Scopolamine by normal root culture of *Hyosciamus niger*. *Biotechnology Letters* 17(9):931-926.

Capítulo 3

Respostas fotoperiódicas de espécies nativas do gênero *Clusia* L.

(GUTTIFERAE)

INTRODUÇÃO

O gênero *Clusia* L. pertence à família Guttiferae e compreende mais de 250 espécies neotropicais, das quais aproximadamente 60 são nativas do Brasil (BITTRICH, 1997). São plantas arbóreas ou arbustivas, hemiepífitas de regiões de floresta úmida e restinga, com raízes aéreas. As folhas glabras e coriáceas lhes conferem ótima característica como plantas ornamentais.

A morfologia floral do gênero é bastante diversificada em função de a maioria das espécies ser dióica (possuir plantas masculinas e femininas). A estrutura floral de cada espécie está relacionada ao tipo de recurso oferecido aos agentes polinizadores. Um grande número de espécies oferece resina como recompensa aos agentes, que são principalmente abelhas (*Trigona*, *Euglossa*, *Melipona*, *Eufriesea*); outras espécies oferecem pólen ou néctar (BITTRICH & AMARAL, 1996). Algumas espécies apresentam, associado à resina, um óleo estaminal cuja função parece ser a de manter a viabilidade do pólen, protegendo-o do contato com a resina ou servir como "pollenkit" (BITTRICH & AMARAL, 1997).

O estudo dos compostos secundários da resina de *C. nemorosa*, *C. rosea*, *C. grandiflora*, *C. insignis*, *C. spiritu-sanctensis* e *C. pernambucanensis* permitiu identificar uma classe de compostos com atividade inibitória no crescimento de microorganismos, a classe das benzofenonas (OLIVEIRA *et al.*, 1996). Estes dados parecem confirmar a hipótese de que as abelhas utilizam as resinas florais como material para a construção do ninho e como meio de evitar a infestação dos mesmos por microorganismos (MARSAIOLI *et al.*, 1997). TOMÁS-BARBERÁN *et al.* (1993) investigaram a origem vegetal dos constituintes do própolis da Venezuela por análise em CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e concluíram que os constituintes são provenientes, em sua maioria, de duas espécies de *Clusia* daquele país: "*C. major*" (c.f. *C. grandiflora*) e *C. minor*.

Pelo exposto, decidiu-se investigar os fatores relacionados com a biologia reprodutiva de *Clusia*. Estes fatores podem ser externos ou internos. Entre os estímulos externos estão a temperatura, o regime hídrico e as condições fotoperiódicas. Fatores internos incluem características fisiológicas da planta como idade, maturidade e competência do tecido, influência dos hormônios vegetais, bem como de elementos nutricionais. As diferenças expressas fenotipicamente entre as fases jovem e adulta de uma planta refletem um padrão de desenvolvimento fisiológico, bioquímico e molecular também distinto (HACKETT, 1992). A separação destas fases pode ser útil no estudo dos

produtos do metabolismo secundário, como em *Hedera helix*. Nesta planta, as folhas jovens acumulam antocianina enquanto as folhas maduras não o fazem (MURRAY & HACKETT, 1991).

A investigação de fatores externos que influem no desenvolvimento e reprodução de espécies tropicais constitui um passo importante na descoberta da relação ambiente-metabolismo secundário destas plantas. *Cistus ladanifer* apresenta uma variação sazonal no conteúdo de flavonóides, que protegem a planta dos efeitos nocivos da irradiação UV, durante o verão (CHAVES et al., 1997).

Poucas espécies tropicais, além das cultivadas e ornamentais, foram estudadas quanto ao fotoperíodo. É importante, pois, aumentar o número de espécies investigadas, tanto para confirmar padrões de comportamento conhecidos quanto para estabelecer outros, o que levaria a uma nova postura na investigação de processos ecofisiológicos (ZAIDAN et al., 1991).

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência do fotoperíodo no crescimento vegetativo e, particularmente, na floração de duas espécies de *Clusia*: *C. nemorosa* G. Mey e *C. fluminensis* Pl. et Tr. *C. nemorosa* pertence à Seção *Chlamydoclusia* e ocorre na Amazônia e nos estados do nordeste e sudeste, de Pernambuco a Minas Gerais e Espírito Santo (populações ginodióicas ocorrem na Bahia, LOPES & MACHADO, 1998). Desta espécie foram isoladas várias classes de compostos, incluindo as benzofenonas. A outra espécie, *C. fluminensis*,

pertence à Seção Cordylandra, ocorre em matas de restinga no Rio de Janeiro e tem sido bastante utilizada em ornamentação (PALAZZO & BOTH, 1993). De *C. fluminensis* foram isolados compostos com atividade hipotensora (NAGEM et al., 1993).

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de *C. nemorosa* (hermafroditas) e plantas de *C. fluminensis* (masculinas) foram coletadas no Centro Experimental (Fazenda Santa Elisa) do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), SP (22°49'45"S, 47°06'33"W).

Para estudos de fotoperiodismo *in vivo* foram utilizadas estacas e plantas jovens, obtidas a partir de sementes, para *C. nemorosa* e apenas estacas para *C. fluminensis*. Os experimentos de fotoperiodismo foram desenvolvidos no Instituto de Botânica de São Paulo, SP.

Obtenção de estacas

Ramos vegetativos das duas espécies foram coletados em março. Destes foram feitas estacas contendo 2-3 nós e uma gema apical, sem a retirada das folhas. Para o tratamento de enraizamento das estacas aplicou-se IBA (Ácido indol-butírico) em pó (10mg/g) na parte basal das estacas antes de serem colocadas no substrato, constituído de vermiculita. As estacas assim tratadas foram mantidas em câmara úmida (U.R. 80%, condição favorável ao enraizamento), em casa-de-vegetação, à temperatura ambiente (não controlada). As estacas enraizadas foram transferidas para terra de mata (Mata de Santa Genebra, Campinas) e passaram por um período de adaptação de uma semana em casa-de-

vegetação, sob luz, temperatura e UR ambiente, antes de ser iniciado o experimento (Figura 1).

Obtenção de plantas jovens

- A) As sementes foram postas para germinar em placas de petri com 5ml de água destilada, após a retirada manual da testa (SALEH & SHEPHERD, 1997). As condições na câmara de germinação foram luz contínua e $T 25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- B) Após 7 dias as plântulas foram transferidas para substrato inerte em casa-de-vegetação e foram regadas semanalmente com solução nutritiva (HOAGLAND & ARNON, 1938) e mantidas sob luz natural;
- C) As plantas jovens assim obtidas foram utilizadas nos experimentos de fotoperíodo, tendo sido antes transferidas para terra de mata (Mata de Santa Genebra, Campinas). Os tratamentos fotoperiódicos tiveram início em abril de 1998, quando as plantas estavam com 9 meses de idade e tinham aproximadamente 10 cm de eixo principal.

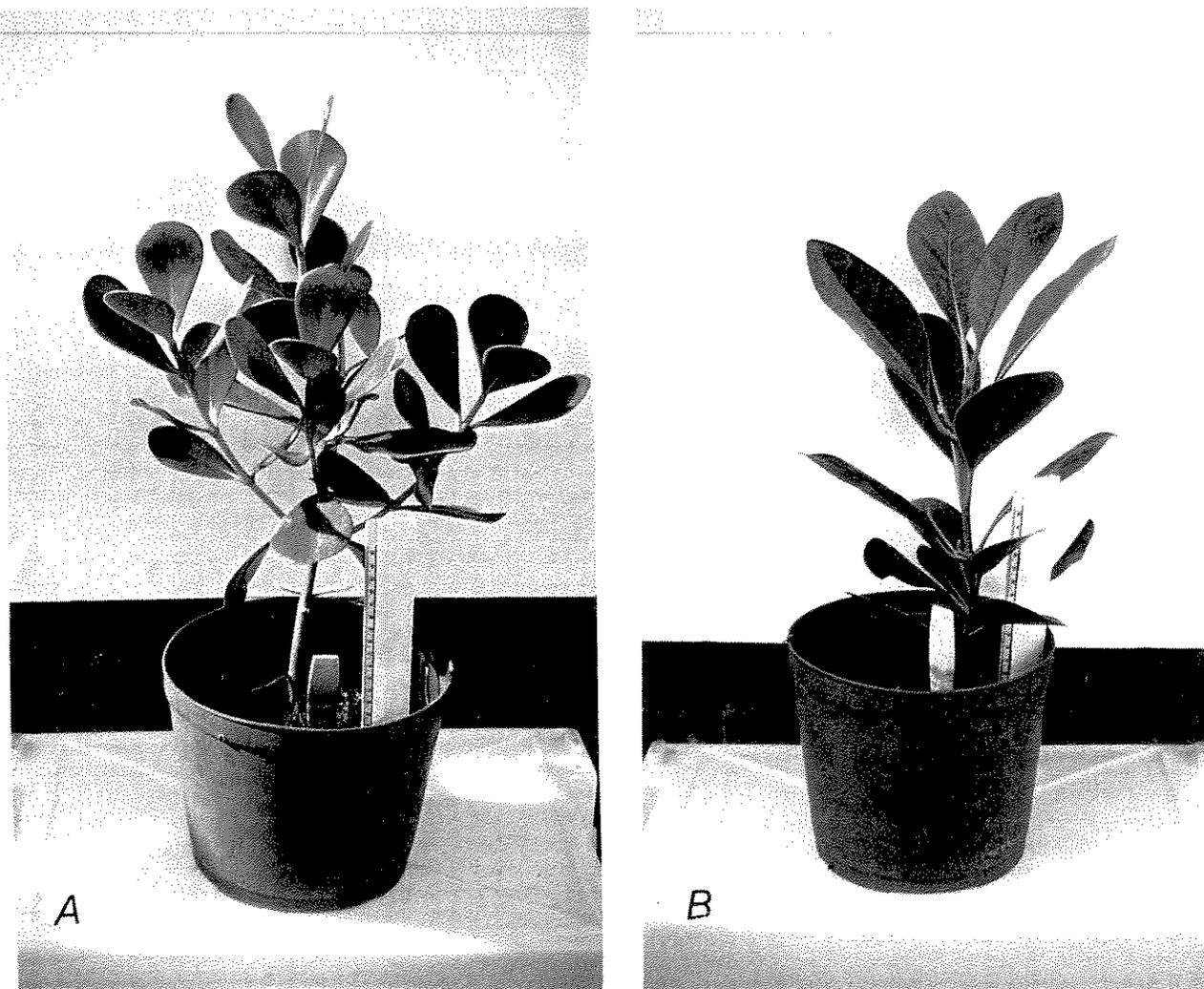


Figura 1: Aspecto de estacas enraizadas de *C. fluminensis* (A) e *C. nemorosa* (B) em terra de mata, mantidas em casa-de-vegetação (UNICAMP), à T e luz ambientes, após 6 meses de enraizamento.

Tratamentos fotoperiódicos

Tanto para as plantas jovens quanto para as estacas foram testados 5 tratamentos fotoperiódicos: 8h, 10h, 18h e 20h e 8h com uma interrupção de 30 min na metade da duração do período de escuro (8h NI). As plantas permaneceram durante o dia das 9:00h às 17:00h na casa-de-vegetação, onde receberam luz natural durante 8h consecutivas. A partir das 17:00h elas foram guardadas em salas escuras onde receberam luz suplementar com as respectivas durações fotoperiódicas. Cada sala possui um conjunto de lâmpadas fluorescente e incandescente, com fluxo de energia de $3,5\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (KLEIN *et al.*, 1992), o que garante o fornecimento de luz de baixa intensidade em todo o espectro e equilibra as quantidades de luz vermelha e vermelho-extremo. Para cada tratamento fotoperiódico foram utilizadas como repetições: para *C. fluminensis* 7 estacas e para *C. nemorosa* 7 plantas jovens e 5 estacas. O experimento teve duração de 6 meses, tendo sido iniciado no final de abril e finalizado em outubro de 1998.

Visualização das respostas

As espécies de *Clusia* são plantas de hábito arbóreo ou arbustivo, apresentam crescimento lento, padrão este que também foi observado em relação à formação de estruturas reprodutivas, tanto em casa-de-vegetação como no campo (IAC). Nesta última condição, a fenologia destas espécies foi acompanhada ao longo de todo o ano de 1997. Devido ao lento padrão de crescimento

observado nas espécies de *Clusia*, optou-se por fazer um acompanhamento quinzenal das plantas sob tratamento. A cada duas semanas foram avaliados: altura do eixo principal, número de nós, folhas, ramos primários e secundários e formação de gemas axilares. Na mesma ocasião também foi observado se estava ocorrendo o início da diferenciação da gema vegetativa em reprodutiva. No final do experimento, depois de 6 meses de tratamento, as folhas das plantas jovens de *C. nemorosa* desenvolvidas sob tratamento foram retiradas para a medida de área foliar e de massa seca. A área foliar foi medida com o auxílio do programa "Leaf Area and Analysis" da Skye Instruments Ltda. Depois, as folhas foram secas em estufa a 60°C por 48h e pesadas em balanças de precisão.

Análise estatística

Ao final do experimento foi feita análise de variância (ANOVA) dos parâmetros de crescimento vegetativo.

RESULTADOS

Verificou-se, primeiramente, que o tempo de enraizamento de estacas nas condições experimentais foi diferente para as duas espécies de *Clusia* estudadas: 6 semanas para *C. fluminensis* e 8 semanas para *C. nemorosa*.

Clusia nemorosa

ESTACAS

A floração de estacas de *C. nemorosa* foi influenciada qualitativa e quantitativamente pelos tratamentos fotoperiódicos. Primeiro, a espécie é sensível ao fotoperíodo; as plantas floresceram a partir do tratamento de 10h de luz e nos dias longos: 18h e 20h e também no tratamento de 8h NI, que simula dias longos. As plantas não floresceram no fotoperíodo de 8h de luz diária, então, o fotoperíodo crítico para floração desta espécie se situaria entre 8h e 10h.

Ocorre também uma diferença na qualidade da resposta. É interessante ressaltar que, embora a porcentagem de plantas com botões entre os tratamentos de 8h NI e 18h tenha sido a mesma, pela fig. 2 pode-se observar que a visualização de botões no fotoperíodo de 8h NI foi três semanas mais precoce (9 semanas) do que no fotoperíodo de 18h (12 semanas). Por esta figura fica também evidente que para a floração de *C. nemorosa* o fotoperíodo de 8h NI foi o mais efetivo: o máximo de floração (60% das

plantas tratadas) foi obtido após 12 semanas, tempo necessário para o início da visualização da floração nos outros fotoperíodos, que alcançaram apenas 20% de plantas floridas. A fig. 2 permite ver outro dado interessante. Embora também tenha-se obtido o valor de 60% de floração sob fotoperíodo de 18h, este valor só foi obtido ao final de 24 semanas, o dobro do período de tempo levado sob fotoperíodo de 8h NI (12 semanas).

Verificou-se que plantas de *C. nemorosa* crescendo no ambiente, em condições não controladas (Faz. Santa Elisa) florescem durante o ano todo. Nestas condições, decorrem dois meses do surgimento dos botões até a abertura da flor. O início da diferenciação do ápice vegetativo em floral, observado macroscopicamente, se caracteriza pelo alargamento do mesmo que adquire um formato mais arredondado, dando início à formação do botão. Em casa-de-vegetação, o início da diferenciação do primeiro botão ocorreu em julho, após nove semanas de tratamento e o desenvolvimento da flor, do início da formação do botão até a sua abertura, levou 45 dias. As plantas que floresceram em condições experimentais apresentaram apenas uma flor por ápice enquanto as plantas que cresceram em condições naturais apresentaram panículas apicais com três flores.

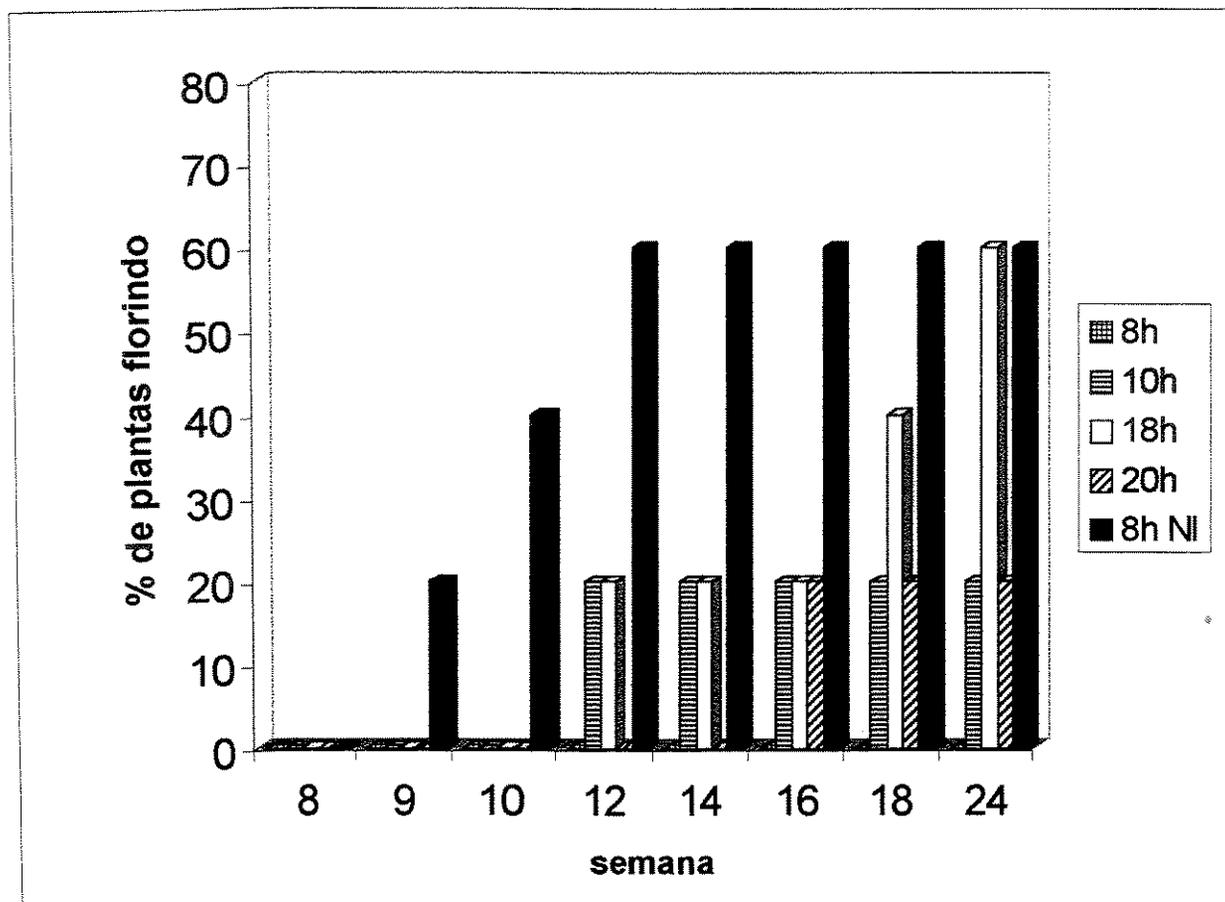


Figura 2: Visualização de botões florais em estacas de *C. nemorosa*, % de plantas floridas por tratamento fotoperiódico, total de 5 plantas, maio a outubro de 1998, em casa-de-vegetação.

PLANTAS JOVENS

As plantas jovens de *C. nemorosa* não floresceram. No entanto, o crescimento vegetativo destas plantas foi avaliado a partir dos seguintes parâmetros: altura do eixo principal, número de nós do eixo principal, extensão do último entrenó, número de folhas, área foliar e massa seca das folhas expandidas e desenvolvidas durante o experimento.

A análise estatística mostrou que para plantas jovens de *C. nemorosa*:

1) em relação à altura do eixo principal o tratamento de 20h diárias de luz promoveu significativamente este parâmetro, enquanto o tratamento de 8h de luz (independente do período de escuro administrado, contínuo ou NI) inibiu o crescimento de altura em relação ao fotoperíodo de 20h. É interessante lembrar que o fotoperíodo de 8h NI equivaleria a um fotoperíodo longo (tabela 1., fig. 3);

2) em relação ao número de nós do eixo principal, apenas o fotoperíodo de 8h de luz diárias promoveu este parâmetro. Este efeito não foi compartilhado pelo tratamento fotoperiódico de 8h NI, que para este parâmetro teve efeito semelhante aos fotoperíodos longos (tabela 2).

As plantas sob os fotoperíodos de 10h, 18h e 20h obtiveram médias maiores para o número de folhas, a área foliar e o peso seco das folhas (tabela 3). Estes dados, no entanto, indicam

apenas uma tendência, já que as diferenças entre as médias são muito pequenas e não são estatisticamente significativas. Essa tendência também ocorre com relação ao comprimento do entrenó mais apical das plantas jovens; porém esta diferença não é estatisticamente significativa.

Tabela 1: Altura do eixo principal de plantas jovens de *C. nemorosa*, média de 7 plantas, \pm desvio-padrão. Teste de Tukey, nível de 5%.

	Altura média inicial Δ_0	Altura média final Δ_f	$\Delta_0 - \Delta_f$
8h	10	19,9	9,9 \pm 1,5 ^a
10h	11	21	10 \pm 2,3 ^{ab}
18h	10,9	21,3	10,4 \pm 2,5 ^{ab}
20h	10,5	21,7	11,2 \pm 1,5 ^b
8h NI	11,2	19,4	8,2 \pm 1,8 ^a
C.V.			22,6
F			3,3
d.m.s.			2,98
p			> 0,05

Tabela 2: Número de nós do eixo principal de plantas de *C. nemorosa*, média de 7 plantas, \pm desvio-padrão. Teste de Tukey, nível de 5%.

	Número de nós inicial	Número de nós final	$\Delta_0 - \Delta_f$
	Δ_0	Δ_f	
8h	7,9	11,9	4 \pm 2,8 ^b
10h	8,6	10,9	2,3 \pm 1,6 ^a
18h	8,6	11,7	3,1 \pm 2,2 ^{ab}
20h	9,3	11,3	2 \pm 1,4 ^a
8h NI	8,6	10,9	2,3 \pm 1,6 ^a
C.V.			44
F			6,6
d.m.s.			1,45
p			> 0,025

Tabela 3: Respostas de área foliar, peso seco das folhas, número de folhas e comprimento do entrenó mais apical de plantas jovens de *C. nemorosa*, média de 7 plantas \pm desvio-padrão

Tratamento	área foliar (cm ²)	peso seco (mg)	número de folhas			entrenó mais apical (cm)
			Δ_0	Δ_f	$\Delta_0 - \Delta_f$	
8h	48,2 \pm 12,9	385 \pm 134	12,9	19,4	6,5	3,2
10h	54,1 \pm 12,8	414 \pm 182	14,0	19,1	5,1	3,5
18h	50,4 \pm 11,8	417 \pm 111	14,0	20,3	6,3	3,6
20h	52,0 \pm 12,7	419 \pm 125	14,3	20,0	5,7	3,5
8h NI	47,3 \pm 18,4	359 \pm 130	13,4	19,4	6,0	3,0
C.V.	26,9	33,1			20,8	-
F	0,4	0,75			1,5	-
d.m.s.	-	215			1,86	-

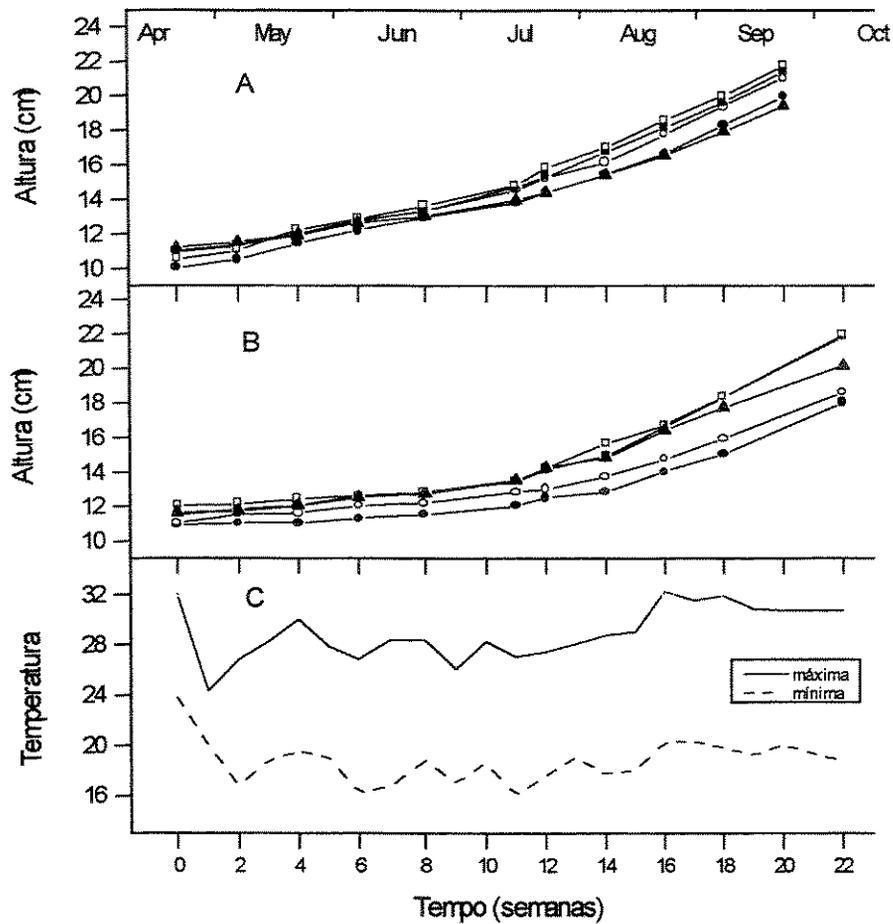


Figura 3: Crescimento do eixo principal em resposta aos tratamentos fotoperiódicos: 8h (●) 10h (○), 18h (■), 20h (□) e 8h NI (▲). A) plantas jovens de *C. nemorosa*, média de 7 plantas; B) estacas de *C. fluminensis*, média de 5 plantas; C) médias das temperaturas semanais (máxima e mínima) em casa de vegetação no período (abril a outubro).

Clusia fluminensis

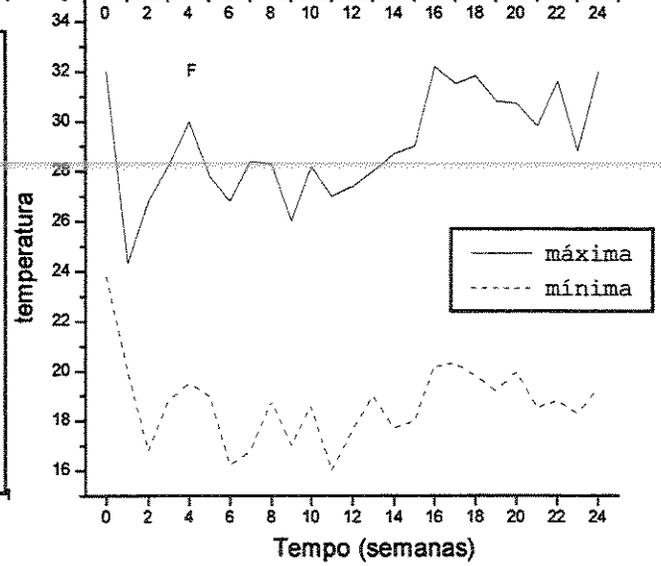
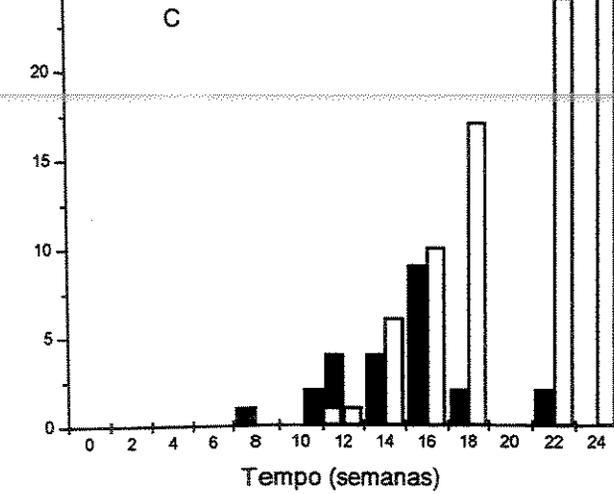
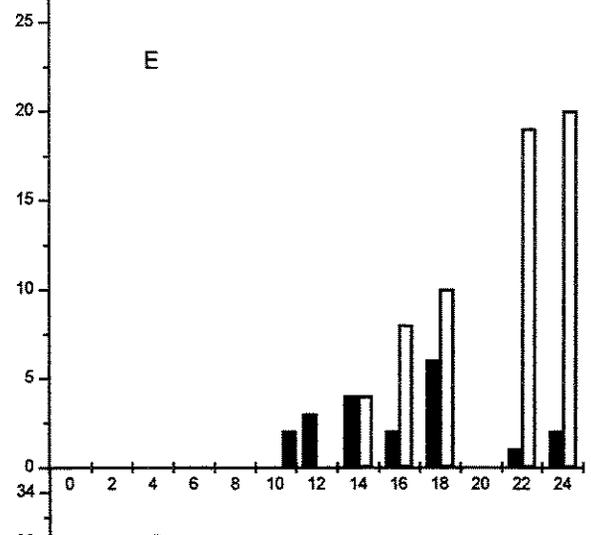
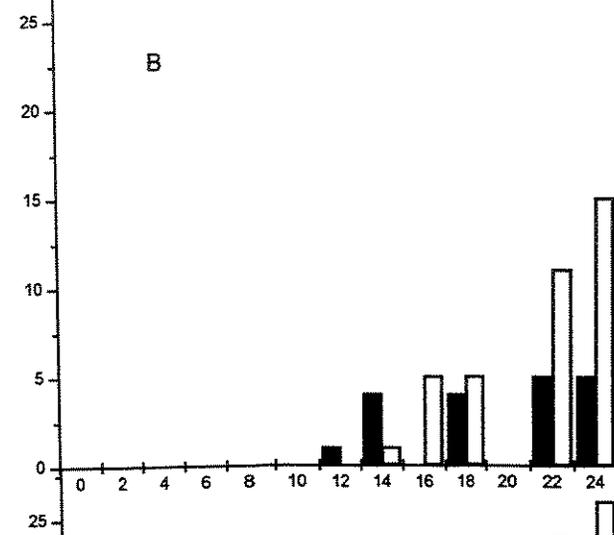
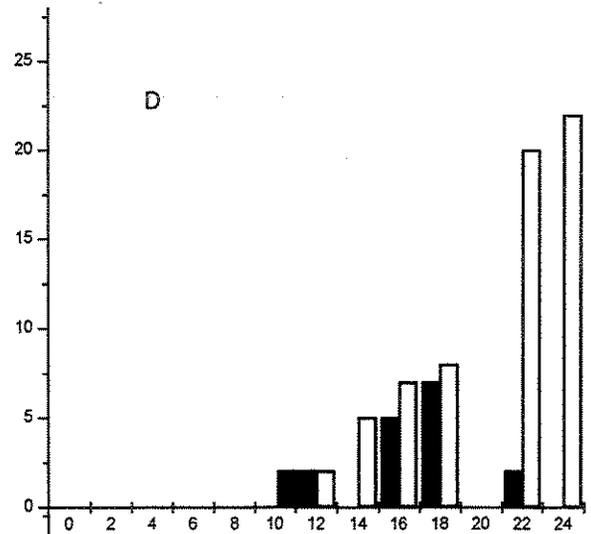
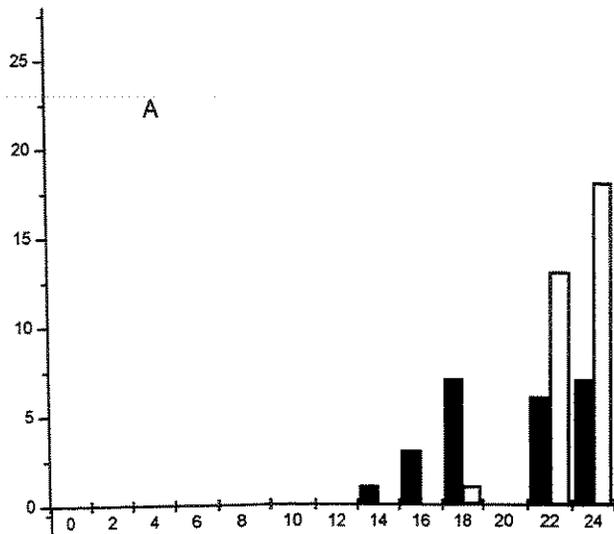
As plantas masculinas de *C. fluminensis* não floresceram no período de 12 meses de observação no IAC. Também as estacas sob tratamento em casa-de-vegetação não responderam aos fotoperíodos permanecendo vegetativas durante os 6 meses de tratamento, o dobro do tempo necessário para a floração de *C. nemorosa*. Como nesta espécie as estacas eram bastante heterogêneas, os parâmetros de crescimento vegetativo utilizados para *C. nemorosa*, embora também avaliados para este material, não apresentaram resultados estatisticamente significativos, com exceção da altura do eixo principal.

Os tratamentos fotoperiódicos de dias longos: 18h, 20h e 8h NI resultaram no alongamento do eixo principal, embora não seja estatisticamente significativo (fig. 3). Desta forma, podemos afirmar apenas que há uma tendência para esta espécie em responder com crescimento vegetativo ao fotoperíodo.

O desenvolvimento de gemas axilares ocorreu apenas em *C. fluminensis*. Assim, o desenvolvimento de ramos laterais foi um parâmetro também avaliado para esta espécie. Embora a quebra da dominância apical possa ser um dos eventos que indiquem o início do desenvolvimento floral (queda na produção de auxina, RUGGIERO & ZAIDAN, 1997), a formação de gemas axilares não resultou em floração, mesmo após 6 meses. Após este período foi possível verificar que: as médias no número de gemas axilares não diferem estatisticamente entre os tratamentos; parece que as plantas

seguem um padrão, padrão este independente do fotoperíodo (fig. 4). Os tratamentos fotoperiódicos não afetaram o número total de gemas axilares visualizadas. Mas estes tratamentos afetam a velocidade de formação de forma gradual: os fotoperíodos longos promovem o surgimento mais rápido das gemas (8^a e 11^a semanas) em relação ao fotoperíodo de 10h (12^a semana) e principalmente de 8h somente (14^a semana) (fig. 4). Ou seja, quanto mais longo o fotoperíodo, mais rápida a visualização das gemas axilares.

Figura 4: Visualização de novas gemas (preto) e ramos laterais (branco) em estacas de *C. fluminensis* sob os tratamentos fotoperiódicos: A) 8h, B) 10h, C) 18h, D) 20h e E) 8h NI, em casa-de-vegetação, de abril a outubro de 1998. F) médias das temperaturas semanais (máxima e mínima) em casa de vegetação no mesmo período.



DISCUSSÃO

A espécie *C. nemorosa* (forma hermafrodita) é uma planta de dias longos (PDL) que floresce em fotoperíodos iguais ou superiores a 10h de luz. Esta resposta está de acordo com as observações feitas na Fazenda Experimental do IAC, Campinas, onde as plantas floresceram durante todo o ano de 1997, sob condições naturais de luz e temperatura. Nesta latitude ($23^{\circ}29'S$) o comprimento do dia ao longo do ano varia de 10,5h a 13,6h (VIANELLO & ALVES, 1991). Apesar de responder aos experimentos de fotoperíodo, no habitat natural, a Amazônia ($03^{\circ}07'S$, $60^{\circ}01'W$), onde o fotoperíodo está próximo de 12h o ano todo, *C. nemorosa* floresce de junho a dezembro (BITTRICH & AMARAL, 1997), mais precisamente de agosto a outubro e na Bahia ($12^{\circ}35'S$, $41^{\circ}32'W$) de outubro a março (Volker Bittrich, comunicação pessoal). Como esta espécie apresenta períodos fenológicos definidos, outros fatores ambientais devem estar envolvidos na resposta de floração, como o regime hídrico. REICH & BORCHERT (1984) acreditam que variações sazonais na disponibilidade de água devem determinar o padrão sazonal de desenvolvimento em árvores tropicais mais do que variações de fotoperíodo e de temperatura. Ainda para estes autores, a fenologia de árvores tropicais seria determinada por um ou mais destes fatores: a disponibilidade de água no solo, a capacidade de captação da água pela planta ou o controle de perda

de água, conclusões tiradas dos resultados de experimentos feitos em florestas decíduas na Costa Rica e Venezuela.

O fato de *C. nemorosa* responder ao fotoperíodo em condições experimentais sugere que a pressão para resposta fotoperiódica de floração tenha ocorrido num período anterior à colonização do habitat atual por esta espécie. CREPET & NIXON (1998) descrevem o fóssil de um novo gênero de Guttiferae, denominado *Paleoclusia* encontrado em um depósito do Cretáceo Superior, em New Jersey, USA. Os autores acreditam que este gênero seja ancestral dos gêneros *Clusia* e *Garcinia* que, se comprovado, pode explicar a resposta fotoperiódica de *C. nemorosa*. No Cretáceo Superior (80 milhões de anos) a região que hoje constitui a América do Norte se situava acima de 30° de latitude Norte e tinha clima tropical e subtropical (KRUTZSCH, 1989).

O maior número de flores por ápice (3) das plantas observadas no IAC em relação às plantas da casa-de-vegetação pode ser devido a vários fatores; um dos mais prováveis é a maior eficiência fotossintética das plantas no campo. Sabe-se que o desenvolvimento da flor no ápice meristemático leva a um dreno de compostos primários para esta região (LARCHER, 1995). Em populações originais ginodióicas, na Bahia, a variação de 1-3 flores por panícula ocorre normalmente (ZAPPI, 1995).

A ausência de resposta de floração das plantas jovens de *C. nemorosa* aconteceu porque este material não deve ter atingido a maturidade para florescer até o final do experimento, quando

estava com 15 meses. De acordo com THOMAS & VINCE-PRUE (1987) a floração só ocorre quando a planta atinge determinado tamanho, independente da idade cronológica; muitas árvores lenhosas apresentam um período juvenil, no qual não florescem, que pode durar até 30-40 anos. As respostas vegetativas das plantas jovens de *C. nemorosa*, para os parâmetros analisados, não são fotoperiódicas dado que os resultados para os fotoperíodos de 8h e 8h NI foram muito semelhantes. O único padrão de resposta de caráter fotoperiódico diz respeito ao número de nós no eixo principal. Plantas de *C. nemorosa* sob o tratamento de 8h incorporaram praticamente o dobro de nós do que as plantas da mesma espécie em fotoperíodos longos, embora não tenha havido diferença significativa na altura do eixo principal ao final do tratamento.

A espécie *C. fluminensis* é indiferente ao fotoperíodo, ou seja, é uma planta de dias neutros (PDN). Esta falta de resposta não parece estar relacionada à maturidade do material, pois o mesmo foi coletado de plantas adultas (com aproximadamente 3m de altura). A metodologia empregada por LONGMAN et al. (1990) permite que árvores de florestas tropicais, como *Triplochiton scleroxylon* que, em condições naturais, demoram 15-30 anos para florescer, floresçam em 18 meses a partir de estacas jovens e formem sementes viáveis. No entanto, utilizando estacas jovens de *C. fluminensis*, não foi possível obter uma flor sequer após 6 meses, tempo mais que suficiente para *C. nemorosa*.

Parece que *C. fluminensis* não é sensível ao fotoperíodo sendo que outros fatores podem estar relacionados com a indução da floração. Segundo BERNIER et al. (1993), qualquer fator ambiental que apresente variações sazonais regulares é um fator potencial no controle da floração. Esta espécie ocorre em regiões de restinga no Rio de Janeiro (22°53'S, 42°52'W, ROBERTS et al., 1996) em formações abertas de bosques esparsos (ARAUJO, 1992). Ecossistemas litorâneos de duna estão sujeitos a grande deposição de sal na forma de "salt spray", a variações sazonais no nível de água do lençol freático e ainda a inundações esporádicas de marés altas ou da elevação do lençol subterrâneo (REINERT et al., 1997). Estes fatores podem estar envolvidos na resposta de floração de espécies de restinga, como *C. fluminensis*. A salinidade pode atrasar ou favorecer a floração dependendo da espécie e do nível nutricional (SHANNON et al., 1994). Em condições de estresse hídrico a árvore *Citrus latifolia* Tan. (lima "Tahiti") é induzida a florescer (SOUTHWICK & DAVENPORT, 1986).

CONCLUSÃO

Apesar de ocorrer em ambientes tropicais onde são pequenas as variações no comprimento do dia, plantas de *C. nemorosa* apresentaram uma clara resposta fotoperiódica de floração. *C. fluminensis*, por outro lado, não teve resposta de floração aos tratamentos fotoperiódicos, mas apresentou diferenças no crescimento vegetativo. A manutenção desse padrão de resposta, embora não mais utilizado por essas plantas em seu habitat natural, indica que o fotoperíodo pode ter tido um papel fundamental no início da evolução deste grupo. Outros fatores ambientais de variação sazonal devem atuar sobre a fenologia destas espécies; o regime pluviométrico seria um destes fatores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, D.S.D., 1992. Vegetation types of sandy coastal plains of tropical Brazil: a first approximation. IN: Coastal plant communities of Latin America (Seeliger U, ed.), Academic Press, San Diego, p.337-347.
- BERNIER, G., HAVELANGE, A., HOUSSA, C., PETITJEAN, A., LEJEUNE, P., 1993. Physiological signals that induce flowering. The Plant Cell 5:1147-55.
- BITTRICH, V., 1997. O Gênero *Clusia* (Guttiferae) para a Floricultura. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental 3:13-19.
- BITTRICH, V. & Amaral M.C.E., 1996. Flower morphology and pollination biology of *Clusia* species from the Gran Sabana (Venezuela). Kew Bulletin 51:681-694.
- BITTRICH, V. & AMARAL, M.C.E., 1997. Floral Biology of some *Clusia* species from Central Amazonia. Kew Bulletin 52:617-635.
- CHAVES, N., ESCUDERO, J.C., GUTIERREZ-MERINO, C., 1997. Role of ecological variables in the seasonal variation of flavonoid content of *Cistus ladanifer* exudate. Journal of Chemical Ecology 23:579-603.
- CREPET, W.L., NIXON, K.C., 1998. Fossil Clusiaceae from the Late Cretaceous (Turonian) of New Jersey and implications

- regarding the history of bee pollination. *American Journal of Botany* 85(8):1122-1133.
- HACKETT, W.P., 1992. Use of juvenile and mature phases of *Hedera helix* to study flowering competence. *Flowering Newslett* 14:21-24.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I., 1938. The water culture method of growing plants without soil. Circular 347, University of California - Agricultural Experiment Station, Berkeley, 39p.
- KLEIN, A.D., ZAIDAN, L.B.P., FELIPPE, G.M., 1992. Flowering and heterophylly in *Bidens gardneri* Baker. *Revista Brasileira de Botânica* 15:139-144.
- KRUTZSCH, W., 1989. Paleogeography and historical phytogeography (paleochorology) in the Neophyticum. IN: *Woody plants - evolution and distribution since the Tertiary* (F. Ehrendorfer, ed.), Springer-Verlag, Wien, p.5-61.
- LARCHER, W., 1995. *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, Berlin.
- LONGMAN, K.A., MANURUNG, R.M., LEAKEY, R.R.B., 1990. Use of small, clonal plants for experiments on factors affecting flowering in tropical trees. IN: *Reproductive ecology of Tropical forest plants* (K.S. Bawa & M. Hadley, ed.), UNESCO and The Parthenon Publishing, Chippenham.
- LOPES, A.V.F. & MACHADO, I.C., 1998. Floral biology and reproductive ecology of *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) in

northeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 213:71-90.

- MARSAIOLI, A.J., PORTO, A.L.M., GONÇALVES, A.C., OLIVEIRA C.M.A. DE, MANFIO, G., BITTRICH, V., 1997. The ecosystem of microorganisms, bees and *Clusia* floral resins and oils from the chemistry point of view. III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, Campinas, resumos, p.11-13.
- MURRAY, J.R. & HACKETT, W.P., 1991. Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L. *Plant Physiology* 97:343-351.
- NAGEM, T.J., MESQUITA, A.A.L., SILVA, R., 1993. Constituents of *Clusia fluminensis*. *Fitoterapia* 64:380.
- OLIVEIRA, C.M.A. DE, PORTO, A.M., BITTRICH, V., VENCATO, I., MARSAIOLI, A.J., 1996. Floral resins of *Clusia* spp.: Chemical composition and biological function. *Tetrahedron Letters* 37:6427-6430.
- PALLAZO, J.T & BOTH, M.C., 1993. Um Guia para o Paisagismo Ecológico. Sagra-DC-Luzzatto, Porto Alegre, p.47-48.
- REICH, P.B. & BORCHERT, R., 1984. Water stress and tree phenology in a tropical dry forest in the lowlands of Costa Rica. *Journal of Ecology* 72:61-74.
- REINERT, F., ROBERTS, A., WILSON, J. M., RIBAS, L. DE, CARDINOT, G., GRIFFITHS, H., 1997. Gradation in nutrient composition

and photosynthetic pathways across the restinga vegetation of Brazil. Bot. Acta 110:135-142.

ROBERTS, A., GRIFFITHS, H., BORLAND, A.M., REINERT, F., 1996. Is crassulacean acid metabolism activity in sympatric species of hemi-epiphytic stranglers such as *Clusia* related to carbon cycling as a photoprotective process? Oecologia 106:28-38.

RUGGIERO, P.G.C. & ZAIDAN, L.B.P., 1997. Estudos de desenvolvimento de *Viguiera robusta* Gardn., uma Asteraceae do cerrado. Revista Brasileira de Botânica 20:1-9.

SALEH, E.O.L. & SHEPHERD, S.L.K., 1997. Estudos de germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Clusia nemorosa* (Guttiferae). IN: III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, Campinas, Brasil, resumos, p.67.

SHANNON, M.C., GRIEVE, C.M., FRANCOIS, L.E., 1994. Whole plant response to salinity. IN: Plant Environment Interactions (E. Wilkinson, ed.), Marcel Dekker, New York, p.210-229.

SOUTHWICK, S.M., DAVENPORT, T.L., 1986. Characterization of water stress and low temperature effects on flower induction in Citrus. Plant Physiology 81:26-29.

THOMAS, B. & VINCE-PRUE, D., 1987. Juvenility, photoperiodism and vernalization IN: Advanced Plant Physiology (M.B. Wilkins, ed.), Longman Scientific and Technical, New York, p.408-426.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A., GARCÍA-VIGUERA, C., VIT-OLIVIER, P., FERRERES, F., TOMÁS-LORENTE, F., 1993. Phytochemical evidence

for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela.
Phytochemistry 34:191-196.

VIANELLO, R.L. & ALVES, A.R. 1991. Meteorologia básica e aplicações. Imprensa Universitária, Viçosa.

ZAIDAN, L.B.P., DIETRICH, S.M.C., SCHWABE, W.W., 1991. Effects of temperature and photoperiod on flowering in *Hyptis brevipes*.
Physiologia Plantarum 81:221-226.

ZAPPI, D.C., 1995. Guttiferae IN: Flora of The Pico das Almas - Chapada Diamantina, Bahia, Brazil (B.L. Stannard, ed.), The trustees of The Royal Botanic Garden, Kent p.329-31.