

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS BOTUCATU

**BIOTECNOLOGIA PARA CONSERVAÇÃO “EX SITU” DE PLANTAS
MEDICINAIS DO CERRADO**

ANA VALÉRIA DE SOUZA

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia (Horticultura).

BOTUCATU – SP

Agosto – 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS BOTUCATU

**BIOTECNOLOGIA PARA CONSERVAÇÃO “EX SITU” DE PLANTAS
MEDICINAIS DO CERRADO**

ANA VALÉRIA DE SOUZA

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia (Horticultura).

BOTUCATU – SP

Agosto - 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Souza, Ana Valéria de, 1977-
S725b Biotecnologia para conservação "ex situ" de plantas
medicinais do cerrado / Ana Valéria de Souza.- Botucatu :
[s.n.], 2006.
ix, 218 f. : il., gráfs, tabs.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Fa-
culdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2006

Orientador: Ana Maria Soares Pereira

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia. 2. Plantas medicinais. 3. Micorriza. 4.
Cerrado. 5. Plantas medicinais - Conservação. I. Pereira,
Ana Maria Soares. II. Universidade Estadual Paulista "Jú-
lio de Mesquita Filho"(Campus de Botucatu). Faculdade de
Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

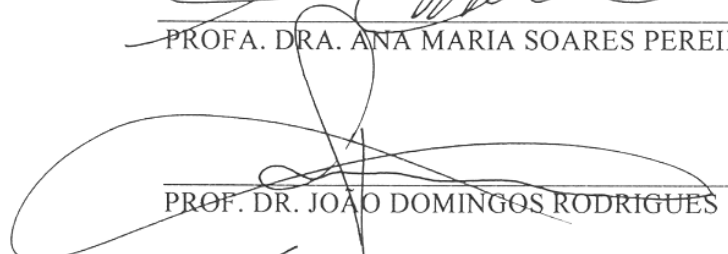
TÍTULO: **BIOTECNOLOGIA PARA CONSERVAÇÃO EX-SITU DE PLANTAS
MEDICINAIS DO CERRADO.**

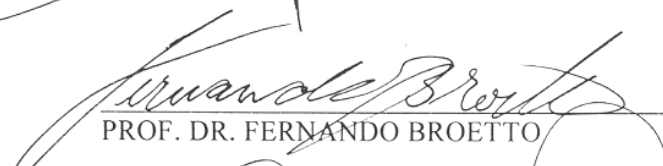
ALUNA: ANA VALERIA DE SOUZA

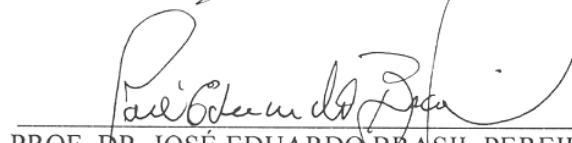
ORIENTADOR: PROFA. DRA. ANA MARIA SOARES PEREIRA

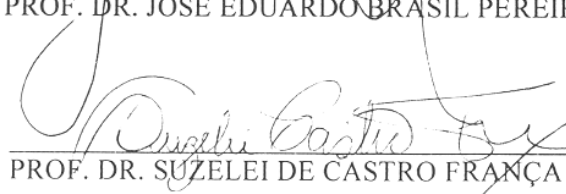
Aprovado pela Comissão Examinadora


PROFA. DRA. ANA MARIA SOARES PEREIRA


PROF. DR. JOÃO DOMINGOS RODRIGUES


PROF. DR. FERNANDO BROETTO


PROF. DR. JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO


PROF. DR. SUZELEI DE CASTRO FRANÇA

Data da Realização: 15 de agosto de 2006

**Aos meus pais José Vitor de Souza e Silvana de Souza
pelo amor incondicional e por toda renúncia
para que eu conquistasse esta vitória**

DEDICO

**À Ana Maria Soares Pereira pelo
esforço constante na busca da
preservação do bioma Cerrado**

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus e ao Nosso Senhor Jesus Cristo, pela minha vida.

À Nossa Senhora Aparecida.

Aos meus pais, pelos ensinamentos, amor, apoio e compreensão; o meu eterno agradecimento. Esta vitória também é de vocês! Obrigada por tudo!

À minha querida irmã Clédna, cunhado Cláudio e sobrinhos, Alessandra, Alécio e André pelo constante incentivo, ensinamentos e admiração.

Ao meu amigo Luciano Donizete Gonçalves, pela amizade, consideração, companheirismo e apoio nos momentos difíceis.

Aos amigos Sheila Isabel, Edieidia Aparecida, Thácia Dal Picollo, Valéria Conde, Rosa de Belém, Janice Valmorbida, Cristiani Kano, Chrystiane Fráguas, Érika e Ricardo, pela amizade, consideração e apoio.

À Sussônia Reis da Silva pela acolhida, amizade, agradável convívio e grande auxílio no tempo que estive em Ribeirão Preto.

À Profa. Dra. Bianca Waléria Bertoni, pela orientação, amizade, confiança e agradável convívio.

Ao prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira, pela acolhida, consideração e agradável convívio.

À Profa. Suzelei de Castro França, PhD, pela disponibilidade das dependências do Departamento de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para a realização deste trabalho e pela participação na banca examinadora.

Aos profs. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto, Dr. João Domingos Rodrigues e Dr. Fernando Broetto, pelas valiosas sugestões e participação na banca examinadora.

Ao prof. PhD. José Oswaldo Siqueira, pela disponibilidade e orientação na realização dos estudos micorrízicos.

Ao técnico do laboratório de microbiologia do solo da Universidade Federal de Lavras, Manoel Aparecido da Silva, pela atenção e auxílio na realização de parte dos trabalhos.

Aos funcionários e amigos do departamento de biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, Rosane, Sônia, Simone, Patrícia, Sr. Niquinho, Buscapé e Paulo e ex-

funcionários José Franciraldo e Rogério Oliveira, pela acolhida, auxílio na realização deste trabalho, amizade e agradável convívio.

Aos profs. Dra. Romy Goto e Dr. Lin Chau Ming, pela consideração, presteza e agradável convívio.

À Capes, pela bolsa concedida durante o curso.

À Fapesp e ao programa Biota - Fapesp, pelo auxílio financeiro.

À Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Botucatu, pela grandiosa oportunidade de qualificar-me.

À Universidade de Ribeirão Preto, em nome da prof. Dra. Suzelei de Castro França.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A vida é um constante aprendizado. Na nossa caminhada encontramos pessoas das mais diferentes convicções. Pessoas que vêm nos ensinar grandes e importantes lições e pessoas a quem nós ensinamos. Tudo dependerá do estado de espírito que cada um se encontra, para que se possa perceber cada momento. Quando temos a sensibilidade de perceber que estamos num momento de aprendizado, a humildade deve prevalecer para que possamos captar todas as lições que as pessoas têm a nos ensinar, pois essas serão nossos mestres, e desse modo, poderemos passar adiante tudo o que aprendemos, na busca de um mundo melhor.

Durante esta etapa da minha vida (doutorado), tive o grande prazer de conviver com uma pessoa magnífica: a minha querida orientadora e amiga Ana Maria Soares Pereira, a quem faço este agradecimento especial.

As palavras serão poucas para expressar todo o sentimento de gratidão e admiração, pois durante o nosso convívio, aprendi muito, em todos os sentidos, mas a lição mais relevante, foi a importância de sermos SERES HUMANOS verdadeiros, no sentido mais profundo da palavra.

Quero parabenizá-la por ser esta pessoa maravilhosa, pela sua humildade, pelo constante esforço na busca da preservação da biodiversidade e pela luta incansável na realização de trabalhos com as plantas medicinais e aplicação da fitoterapia, pelo lindo trabalho que realiza na Terra de Ismael e por todas as suas conquistas. Você é uma pessoa muito nobre, um exemplo de amor ao próximo.

Quero agradecer pela confiança que depositou em mim em todos os momentos para a realização deste trabalho, pela orientação, auxílio, amizade, consideração, apoio e valiosos ensinamentos.

Que Deus a ilumine sempre!

MUITO OBRIGADA POR TUDO!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1 Plantas Medicinais do Cerrado	9
2.2 Aspectos taxonômicos, descrição botânica e importância das espécies em estudo	12
2.2.1 <i>Anemopaegma arvense</i> (Vell.) Stell. ex de Souza	12
2.2.2 <i>Mandevilla illustris</i> (Vell.) R. E. Woodson	15
2.2.3 <i>Mandevilla velutina</i> (Mart.) Woodson	18
2.3 Conservação de recursos genéticos vegetais <i>in vitro</i>	21
2.4 Marcadores moleculares	25
2.5 Enraizamento de plantas cultivadas <i>in vitro</i>	28
2.5.1 Níveis de auxina endógena	29
2.5.2 Juvenilidade	31
2.5.3 Genótipo	33
2.5.4 Qualidade das plântulas cultivadas <i>in vitro</i>	34
2.5.5 Meio de cultura	34
2.5.6 Reguladores de crescimento	36

2.5.7 Vitaminas, aminoácidos e outras substâncias	41
2.5.8 Nutrição mineral	41
2.5.9 Carboidratos	42
2.5.10 Carvão ativado	43
2.5.11 Poliaminas	45
2.5.12 Compostos fenólicos	46
2.5.13 Condições ambientais	48
2.6 Micorrizas	50
3. MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1 ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Anemopaegma arvense</i> (Vell.) Stell. ex de Souza, <i>Mandevilla illustris</i> (Vell.) R. E. Woodson e <i>Mandevilla velutina</i> (Mart.) Woodson	57
3.1.1 Condições gerais do experimento	57
1) Efeito do tempo de permanência dos explantes em presença de NAA e IBA	58
2) Efeito de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas	59
3) Efeito de auxinas e poliaminas	59
4) Efeito do Dithiothreitol (DTT)	60
5) Efeito do nitrato de prata (AgNO ₃) e tempo de permanência no meio de cultura	61
6) Efeito do ácido bórico e NAA	61
7) Efeito do floriglucinol e NAA	62
8) Efeito da concentração de NAA e IBA e presença de carvão ativado em meio líquido e sólido	62
3.2 DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Mandevilla velutina</i> (Mart.) Woodson E INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE DIFERENTES GENÓTIPOS PARA A CONSERVAÇÃO EM BANCO	

DE GERMOPLASMA	64
3.2.1 Análise da diversidade genética	64
3.2.1.1 Coleta	64
3.2.1.2 Extração do DNA	64
3.2.1.3 Otimização do Protocolo de amplificação RAPD	65
3.2.1.4 Variabilidade genética dentro e entre populações	65
3.2.2 Introdução dos genótipos <i>in vitro</i>	66
2.2.1 Assepsia	66
3.3 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO MICORRÍZICA E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE MICORRIZA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Anemopaegma arvense</i> (Vell.) Stell. ex de Souza	67
3.3.1 Condições gerais do experimento	67
3.3.2 Extração e observação microscópica de esporos do solo	67
3.3.3 Extração, coloração e observação microscópica de infecção micorrízica nas raízes	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1 ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Anemopaegma arvense</i> (Vell.) Stell. ex de Souza, <i>Mandevilla illustris</i> (Vell.) R. E. Woodson e <i>Mandevilla velutina</i> (Mart.) Woodson	69
1) Efeito do tempo de permanência dos explantes em presença de NAA e IBA	69
2) Efeito de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas	98
3) Efeito de auxinas e poliaminas	116
4) Efeito do Dithiothreitol (DTT)	124
5) Efeito do nitrato de prata (AgNO ₃) e tempo de permanência no meio de cultura	131
6) Efeito do ácido bórico e NAA	134

7) Efeito do floroglucinol e NAA	137
8) Efeito da concentração de NAA e IBA e presença de carvão ativado em meio líquido e sólido	141
4.2 DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Mandevilla velutina</i> (Mart.) Woodson E INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE DIFERENTES GENÓTIPOS PARA A CONSERVAÇÃO EM BANCO DE GERMOPLASMA	149
4.2.1 Análise da diversidade genética	149
4.2.1.1 Coleta	149
4.2.1.2 Otimização do protocolo de amplificação RAPD	151
4.2.1.3 Variabilidade genética entre e dentro de populações, estrutura e distâncias genéticas	153
4.2.2 Introdução dos genótipos <i>in vitro</i>	165
4.2.2.1 Assepsia	165
4.3 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO MICORRÍZICA E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE MICORRIZA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Anemopaegma arvense</i> (Vell.) Stell. ex de Souza	167
4.3.1 Identificação das espécies	167
4.3.2 Avaliação da infecção micorrízica nas raízes	174
5. CONCLUSÕES	180
5.1 ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Anemopaegma arvense</i> (Vell.) Stell. ex de Souza, <i>Mandevilla illustris</i> (Vell.) R. E. Woodson e <i>Mandevilla velutina</i> (Mart.) Woodson	180
5.2 DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Mandevilla velutina</i> (Mart.) Woodson E INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE DIFERENTES GENÓTIPOS PARA A CONSERVAÇÃO EM BANCO DE GERMOPLASMA	181
5.3 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO MICORRÍZICA E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE MICORRIZA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Anemopaegma arvense</i> (Vell.) Stell. ex de Souza	181

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	182
APÊNDICE	217

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Mandevilla illustris</i> em função de diferentes tempos de permanência em diferentes concentrações de ANA ou IBA, aos 30 dias	71
TABELA 2: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função de diferentes tempos de permanência em diferentes concentrações de ANA aos 30 e 60 dias	82
TABELA 3: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função de diferentes tempos de permanência em diferentes concentrações de IBA aos 30 e 60 dias	83
TABELA 4: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Anemopaegma arvense</i> em função de diferentes tempos de permanência em diferentes concentrações de ANA ou IBA, aos 30 dias	91
TABELA 5: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Mandevilla illustris</i> em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas em meio MS e MS/2, aos 30 dias	99
TABELA 6: Valores médios das variáveis de resposta para número (NR) e comprimento de raiz (CR - cm) e comprimento da parte aérea (PA - cm) de brotações de <i>Mandevilla illustris</i> em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas, em meio MS e MS/2, aos 30 dias	101
TABELA 7: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas em meio MS e MS/2, aos 30 dias	105
TABELA 8: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas em meio MS e MS/2, aos 60 dias	106
TABELA 9: Valores médios das variáveis de resposta para número (NR) e comprimento de raiz (CR - cm) e comprimento da parte aérea (PA - cm) de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas, em meio MS e MS/2, aos 30 dias	108
TABELA 10: Valores médios das variáveis de resposta para número (NR) e comprimento de raiz (CR - cm) e comprimento da parte aérea (PA - cm) de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas, em meio MS e MS/2, aos 60 dias	110

TABELA 11: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Anemopaegma arvense</i> em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas em meio MS/2, aos 30 dias	112
TABELA 12: Valores médios das variáveis de resposta para número (NR) e comprimento de raiz (CR - cm) e comprimento da parte aérea (PA - cm) de brotações de <i>Anemopaegma arvense</i> em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas, em meio MS/2, aos 30 dias	113
TABELA 13: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Mandevilla illustris</i> em função de diferentes concentrações de espermidina, associada a 1 mgL ⁻¹ de NAA, aos 30 e 60 dias	118
TABELA 14: Valores médios das variáveis de resposta para número (NR) e comprimento de raiz (CR - cm) e comprimento da parte aérea (PA - cm) de brotações de <i>Mandevilla illustris</i> em função de diferentes concentrações de espermidina, associada a 1 mgL ⁻¹ de NAA, aos 30 e 60 dias	119
TABELA 15: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função de diferentes concentrações de putrescina associada a 1 mgL ⁻¹ de NAA, aos 30 e 60 dias	120
TABELA 16: Valores médios das variáveis de resposta para número (NR) e comprimento de raiz (CR - cm) e comprimento da parte aérea (PA - cm) de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função de diferentes concentrações de putrescina, associada a 1 mgL ⁻¹ de NAA, aos 30 dias	121
TABELA 17: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Mandevilla illustris</i> em função de diferentes concentrações de dithiothreitol (DTT), aos 30 e 60 dias	125
TABELA 18: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função de diferentes concentrações de dithiothreitol (DTT), aos 30 e 60 dias.....	127
TABELA 19: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Anemopaegma arvense</i> em função de diferentes concentrações de dithiothreitol (DTT), aos 30 e 60 dias	128
TABELA 20: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função de diferentes concentrações de nitrato de prata (AgNO ₃) em diferentes tempos de permanência, aos 60 dias	132
TABELA 21: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função de diferentes concentrações ácido bórico em diferentes tempos de permanência	136
TABELA 22: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função da interação floroglucinol x NAA, aos 60 dias	138
TABELA 23: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em	

função de diferentes concentrações de NAA em meio MS/2 líquido com carvão ativado, aos 60 dias	142
TABELA 24: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função de diferentes concentrações de IBA em meio MS/2 líquido com carvão ativado, aos 60 dias	142
TABELA 25: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função de diferentes concentrações de NAA em meio MS/2 semi-sólido com carvão ativado, aos 60 dias	143
TABELA 26: Porcentagem de enraizamento de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função de diferentes concentrações de IBA em meio MS/2 semi-sólido com carvão ativado, aos 60 dias	143
TABELA 27: Acessos de <i>Mandevilla velutina</i> utilizados no estudo da variabilidade genética por meio de marcadores RAPD	149
TABELA 28: Iniciadores utilizados e marcadores RAPD obtidos para 64 indivíduos de <i>Mandevilla velutina</i>	152
TABELA 29: Estatística descritiva básica das populações de <i>Mandevilla velutina</i> estudadas	154
TABELA 30: Comparação entre os Índices de diversidade genética de Shannon e de Nei nas populações de <i>Mandevilla velutina</i>	156
TABELA 31: AMOVA entre e dentro de populações para os 111 indivíduos de <i>Mandevilla velutina</i>	158
TABELA 32: Populações de <i>Mandevilla velutina</i> com localização geográfica, número de amostras e distâncias entre as populações	163
TABELA 33: Genótipos de <i>Mandevilla velutina</i> introduzidos em banco de germoplasma <i>in vitro</i>	166
TABELA 34: Identificação de espécies e contagem de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em diferentes variedades de <i>Anemopaegma arvense</i> coletadas em diferentes locais	168
TABELA 35: Avaliação da infecção micorrízica nas raízes de diferentes variedades de <i>Anemopaegma arvense</i> coletadas em diferentes locais	175

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Aspecto geral de <i>Anemopaegma arvense</i> (Vell.) Stell. ex de Souza	14
Figura 2: Aspecto geral de <i>Mandevilla illustris</i> (Vell.) R. E. Woodson	17
Figura 3 A e 3 B: Aspecto geral de <i>Mandevilla velutina</i> (Mart.) Woodson e detalhe do sistema subterrâneo	20
FIGURA 4: Número de raiz de plântulas de <i>Mandevilla illustris</i> em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mgL^{-1}), aos 30 dias	72
FIGURA 5: Comprimento de raiz (cm) de plântulas de <i>Mandevilla illustris</i> em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mgL^{-1}), aos 30 dias	75
FIGURA 6: Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de <i>Mandevilla illustris</i> em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mgL^{-1}), aos 30 dias	76
FIGURA 7: Número de raiz de plântulas de <i>Mandevilla illustris</i> em função da concentração de IBA (mgL^{-1}), aos 30 dias	78
FIGURA 8: Comprimento de raiz de plântulas de <i>Mandevilla illustris</i> em função da concentração de IBA (mgL^{-1}), aos 30 dias	79
FIGURA 9: Comprimento da parte aérea de plântulas de <i>Mandevilla illustris</i> em função da interação concentração de IBA (mgL^{-1}) x tempo de permanência, aos 30 dias	80
FIGURA 10: Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de <i>Mandevilla velutina</i> em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mgL^{-1}), aos 30 dias	85
FIGURA 11: Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de <i>Mandevilla velutina</i> em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mgL^{-1}), aos 60 dias	86
FIGURA 12: Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de <i>Mandevilla velutina</i> em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de IBA (mgL^{-1}), aos 30 dias	87
FIGURA 13: Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de <i>Mandevilla velutina</i> em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de IBA	

(mgL ⁻¹), aos 60 dias	88
FIGURA 14: Número de raiz de plântulas de <i>Anemopaegma arvense</i> em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mgL ⁻¹), aos 30 dias	92
FIGURA 15: Comprimento de raiz (cm) de plântulas de <i>Anemopaegma arvense</i> em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mgL ⁻¹), aos 30 dias	93
FIGURA 16: Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de <i>Anemopaegma arvense</i> em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mgL ⁻¹), aos 30 dias	94
FIGURA 17: Número de raiz de plântulas de <i>Anemopaegma arvense</i> em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de IBA (mgL ⁻¹), aos 30 dias	95
FIGURA 18: Comprimento de raiz (cm) de plântulas de <i>Anemopaegma arvense</i> em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de IBA (mgL ⁻¹), aos 30 dias	96
FIGURA 19: Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de <i>Anemopaegma arvense</i> em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de IBA (mgL ⁻¹), aos 30 dias	97
FIGURA 20: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de <i>Mandevilla illustris</i> em função da interação diaminas e/ou poliaminas x concentração, em MS, aos 30 dias	102
FIGURA 21: Comprimento da raiz (cm) de brotações de <i>Mandevilla illustris</i> em função de diferentes concentrações de diaminas poliaminas, em meio MS/2, aos 30 dias	103
FIGURA 22: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de <i>Mandevilla illustris</i> em função da interação diaminas e/ou poliaminas x concentração, em meio MS/2, aos 30 dias	104
FIGURA 23: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas, em meio MS, aos 30 dias	109
FIGURA 24: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de <i>M. velutina</i> em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas, em meio MS, aos 60 dias	111
FIGURA 25: Comprimento da parte aérea de brotações de <i>Mandevilla illustris</i> em	

função da concentração de dithiothreitol (DTT - mgL^{-1}), aos 30 dias	126
FIGURA 26: Comprimento da parte aérea de brotações de <i>Mandevilla illustris</i> em função da concentração de dithiothreitol (DTT - mgL^{-1}), aos 60 dias	126
FIGURA 27: Comprimento da parte aérea de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função da concentração de dithiothreitol (DTT - mgL^{-1}), aos 30 dias	128
FIGURA 28: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função da interação concentração de AgNO_3 (mgL^{-1}) x tempo de permanência, aos 60 dias	133
FIGURA 29: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de <i>Mandevilla velutina</i> em função de diferentes concentrações de floroglucinol (mgL^{-1}), aos 60 dias	139
FIGURA 30: Plântulas de <i>Mandevilla illustris</i> enraizadas em MS/2 + 1 mgL^{-1} de NAA com tempo de permanência de 15 dias	146
FIGURA 31: Plântulas de <i>Mandevilla illustris</i> enraizadas em MS/2 + 1 mgL^{-1} de NAA com tempo de permanência de 15 dias. Detalhe das raízes	146
FIGURA 32: Plântulas de <i>Mandevilla velutina</i> enraizadas em MS/2 + 1 mgL^{-1} de NAA com tempo de permanência de 15 dias	147
FIGURA 33: Plântulas de <i>Mandevilla velutina</i> enraizadas em MS/2 + 1 mgL^{-1} de NAA com tempo de permanência de 15 dias. Detalhe das raízes	147
FIGURA 34: Plântulas de <i>Anemopaegma arvense</i> enraizadas MS/2 + 2 mgL^{-1} de NAA com tempo de permanência de 15 dias	148
FIGURA 35: Plântulas de <i>Anemopaegma arvense</i> enraizadas MS/2 + 2 mgL^{-1} de NAA com tempo de permanência de 15 dias Detalhe: comprimento parte aérea e raízes	148
FIGURA 36: Perfil das bandas RAPD em populações naturais de <i>Mandevilla velutina</i>	153
FIGURA 37: Gráfico do resultado da análise de variância de frequências alélicas (estimativas θ_p) para <i>Mandevilla velutina</i>	159
FIGURA 38: Padrão de divergência genética entre as três populações de <i>Mandevilla velutina</i> amostradas nos estados de São Paulo e Minas Gerais	162
Figura 39: Espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) identificados em <i>Anemopaegma arvense</i>	172
Figura 40: Espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) identificados em	

<i>Anemopaegma arvense</i>	173
Figura 41: Raiz de <i>Anemopaegma arvense</i> var. <i>glabra</i>	177
Figura 42: Raiz de <i>Anemopaegma arvense</i> var. <i>puberula</i>	178
Figura 43: Raiz de <i>Anemopaegma arvense</i> var. <i>petiolata</i>	179

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA : ácido abscísico
ANOA: ácido beta-naftoxiacético
AFLP: polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
ApCFA: ácido p-cloroenoxiacético
BDT: Base de Dados Tropical.
CENARGEM: Centro Nacional de Recursos Genéticos
DNA: ácido desoxirribonucleico
DTT: dithiothreitol
2,4-D: 2,4-diclorofenolacético
EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESALQ/USP: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
FAO: Organização para agricultura e alimentação
FMA: fungo micorrízico arbuscular
GA₃: ácido giberélico
GPS: Sistema de Posicionamento Global
HPM-UNAERP: Herbário de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto
IAA: ácido indol acético
IBA: ácido indol butírico
2iP: isopenteniladenina
MA: micorriza arbuscular
MS: Murashige & Skoog
NAA: ácido naftaleno acético
OMS: Organização Mundial da Saúde
PCR: reação em cadeia da polimerase
pH: potencial hidrogeniônico
RAPD: polimorfismo de DNA amplificado ao acaso
RFLP: polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
SCAR: regiões amplificadas caracterizadas por seqüência

SSR: seqüências simples repetidas

STS: sítios marcados por seqüência

UNAERP: Universidade de Ribeirão Preto

WPM: Wood Plant Medium – meio para plantas lenhosas

ZEA: zeatina

BIOTECNOLOGIA PARA CONSERVAÇÃO “EX SITU” DE PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO

RESUMO – O bioma Cerrado é uma das regiões mais ricas do Brasil no tocante a diversidade de plantas medicinais, sendo atualmente, considerado uma área “hotspots” devido o alto grau de endemismo das espécies e a velocidade de degradação que vem sofrendo. *Anemopaegma arvense*, *Mandevilla illustris* e *Mandevilla velutina*, são plantas medicinais endêmicas do cerrado, muito utilizadas na medicina popular devido suas propriedades terapêuticas. A coleta indiscriminada realizada pela população, como também por laboratórios farmacêuticos para a fabricação de medicamentos, tem colocado essas espécies em risco de extinção. Ferramentas biotecnológicas como a técnica da micropropagação e biologia molecular para análise do DNA, têm sido amplamente usadas para a produção, conservação e análise da diversidade genética de espécies nativas. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos estudar a variabilidade genética em diferentes populações de *M. velutina* por meio do marcador molecular RAPD e estabelecer a conservação em bancos de germoplasma *in vitro*; desenvolver protocolos eficientes de enraizamento *in vitro* para *A. arvense*, *M. illustris* e *M. velutina*; verificar a ocorrência e identificar espécies de micorrizas, avaliando a colonização em raízes de plantas de diferentes populações e variedades de *A. arvense*. Para os estudos de enraizamento *in vitro*, as brotações foram submetidas a ação de diferentes substâncias que apresentam efeito sobre a formação de raízes adventícias, sob variadas condições. Para a análise da diversidade genética, utilizou-se a técnica de Polimosfirmo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) e para os estudos micorrízicos, realizou-se a avaliação da infecção micorrízica nas raízes e a identificação de espécies de fungos micorrízicos extraídos do solo. As espécies comportaram-se de maneira diferente quanto a indução de raízes adventícias *in vitro*, mostrando a influência direta do genótipo no processo de enraizamento. Para as espécies *M. illustris* e *A. arvense*, 73,3% e 50% das brotações enraizaram quando permaneceram durante 15 dias em 1 e 2 mgL⁻¹ de ácido naftaleno acético (NAA), respectivamente. Para *M. velutina*, 47% das plântulas enraizaram em 0,25 mgL⁻¹ de dithithreitol (DTT). A análise molecular de variância (AMOVA) mostrou que a variabilidade dentro das populações (81,25%) foi maior que entre populações (18,75%), e as estimativas de variação de Φ_{ST} (0,188) e θ_P (0,1586) indicam alta estruturação populacional. Todas as variedades de *A. arvense* apresentaram

colonização micorrízica, através da presença de hifas. Entre as espécies de fungos micorrízicos identificadas, encontram-se *Acaulospora scrubiculata*, *A. spinosa*, *A. longula*, *Scustelospora heterogama*, *Paraglomus occultum*, *Gigaspora margarita* e *Gigaspora* sp.

Palavras-Chave: *Anemopaegma arvense*, *Mandevilla velutina*, *Mandevilla illustris*, enraizamento *in vitro*, banco de germoplasma, diversidade genética, micorriza.

BIOTECHNOLOGY FOR THE “EX SITU” CONSERVATION OF CERRADO MEDICINAL PLANTS

ABSTRACT - The Bioma Cerrado is one of the richest regions in Brazil due to the variety of native medicinal plants, and nowadays it is considered a hotspot area because of the high degree of endemism of the species and the speed of degradation that it has been submitted. *Anemopaegma arvense*, *Mandevilla illustris* and *Mandevilla velutina*, are medicinal plants endemic of Cerrado very used in the popular medicine due to their therapeutic properties. The indiscriminate collection accomplished by the population, as well by pharmaceutical laboratories for the formulation of medicines, has put those species in risk of extinction. Biotechnological tools as the technique of micropropagation and molecular biology for the analysis of the DNA, have been widely used for the production, conservation and analysis of the genetic diversity of native species. In this context, the current work was investigate the genetic variability in different populations of *M. velutina* by means of molecular marker RAPD and to establish a protocol for *in vitro* conservation in germplasm bank; to develop efficient protocol of *in vitro* rooting for *A. arvense*, *M. illustris* and *M. velutina*; to verify the occurrence and to identify species of mycorrhiza, colonizing plant roots of different populations and varieties of *A. arvense*. For the studies of *in vitro* rooting, the plantlets were exposed to the action of different exogenous substances that a effect the formation of adventitious roots, under several conditions. For the analysis of genetic diversity, it was used the technique of Random Amplified Polymorphic DNA at (RAPD) and for the studies on influence of mycorrhizal infection on root development and identification of species of fungi present in the soil. The species behaved in a different ways of induction of adventitious roots in vitro. For the species *M. illustris* and *A. arvense*, 73,3% e 50% of plantlets rooted after fifteen days in treatment with 1 and 2 mg.L⁻¹ of NAA, respectively. For *M. velutina*, 47% of the plantlets rooted in 0,25 mg.L⁻¹ of DTT. The molecular analysis of variance (AMOVA) showed that the variability within the populations (81,25%) was highr than among populations (18,75%), and the estimates of variation of Φ_{ST} (0,188) e θ_P (0,1586) indicate high variability of population structure. All the varieties of *A. arvense* presented colonization mycorrhizal, through the presence of hyphas. Among the species of identified mycorrhize

fungi found were *Acaulospora scrubiculata*, *A. spinosa*, *A. longula*, *Scustelospora heterogama*, *Paraglomus occulum*, *Gigaspora margarita* and *Gigaspora* sp.

Key-words: *Anemopaegma arvense*, *Mandevilla velutina*, *Mandevilla illustris*, *in vitro* rooting, germplasm bank, genetic diversity, mycorrhiza.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o país que apresenta maior diversidade genética vegetal do mundo, com cerca de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies (Sandes & Di Blasi, 2000). A alta diversidade florística encontrada nos diversos biomas brasileiros representa 20 a 22% do total mundial (Pires, 1999; Pinto *et al.*, 2002) com espécies úteis ou potencialmente úteis ao homem, que vem contribuindo para o avanço da medicina, indústria e agricultura (Brito, 2003). A diversidade em termos de estrutura e de propriedades químicas de substâncias biologicamente ativas que ocorrem na natureza, tem sido utilizadas direta ou indiretamente para o desenvolvimento e a síntese de um grande número de fármacos.

O quadro atual tem mostrado um crescente interesse de grupos de pesquisa buscando comprovar e validar cientificamente o potencial terapêutico das espécies nativas. No entanto, o número de trabalhos biotecnológicos, agronômicos, etnobotânicos e fitoquímicos realizados ainda é muito reduzido, quando comparado ao valioso conhecimento empírico de raizeiros e ao mega acervo genético vegetal encontrado nos biomas brasileiros. Apenas 8% da flora nativa foi estudada na busca de compostos bioativos e somente 1.100 espécies vegetais foram avaliadas de alguma forma quanto as propriedades medicinais (Guerra & Nodari, 2001).

Este fato torna-se ainda mais preocupante, quando nos referimos às plantas medicinais endêmicas do Cerrado, considerando que este bioma tem sido devastado

intensamente pelas pressões antrópicas. De acordo com Moraes *et al.*, (2003), 40% da vegetação natural do cerrado já foi devastada e apenas 1,5% de sua extensão está protegida por lei.

O Cerrado é considerado uma área “hotspots” devido o alto grau de endemismo das espécies e a velocidade de degradação que vem sofrendo, sendo um dos biomas prioritários em programas de conservação. Inúmeras espécies medicinais do cerrado, encontram-se ameaçadas de extinção (Silva, 1994; Almeida *et al*, 1998; Mendonça e Lins, 2000; Vieira & Martins, 2000; Brito, 2003; Souza, 2003; Neto & Moraes, 2003).

Atualmente inúmeros estudos com plantas medicinais estão associados a biotecnologia podendo agregar valores nos produtos gerados. Técnicas de biologia molecular permitem a detecção da variabilidade genética entre indivíduos e/ou populações, e sua associação com técnicas de micropropagação e criopreservação, têm contribuído de modo significativo nos trabalhos de melhoramento vegetal e conservação *ex situ* dos recursos genéticos vegetais nativos, como as plantas medicinais do cerrado.

A técnica da micropropagação tem sido consideravelmente empregada neste contexto (Fidelis, 1998; Coelho, 1999; Bonilla, 2002; Biondo, 2003; Souza, 2003), uma vez que centenas de plantas medicinais podem ser clonadas e disponibilizadas para recompor áreas, ou atender a demanda do mercado de fitoterápicos, através do fornecimento de matéria-prima para a indústria farmacêutica, além de permitir a manutenção em bancos de germoplasma *in vitro* de raros e importantes genótipos.

Entretanto, o enraizamento é uma das etapas que mais dificultam o completo desenvolvimento de um protocolo de micropropagação. O desenvolvimento do sistema radicular a partir da formação de raízes adventícias em plantas propagadas vegetativamente sob condições *in vitro* é um processo de grande complexidade, envolvendo fatores endógenos e exógenos que ainda não estão completamente elucidados.

Dentre os fatores relacionados a maior ou menor capacidade de determinadas espécies formarem raízes adventícias, citam-se o estágio de desenvolvimento da planta, o genótipo, as condições de estresse que a planta está submetida, o crescimento da planta em relação a luminosidade, a presença de substâncias nitrogenadas e substâncias de reserva como os carboidratos, a nutrição mineral e a presença de compostos fenólicos. Para os estudos *in vitro*, deve-se ainda considerar o estado físico e a concentração do meio de cultura,

o pH, a presença e/ou ausência de reguladores de crescimento como auxinas, citocininas e/ou giberelina, além de vitaminas e aminoácidos, a relação concentração auxina e tempo de exposição do explante neste regulador, a necessidade da suplementação do meio com uma fonte de carboidrato, o comprimento da parte aérea e a necessidade da presença de folhas, dentre outros (McCown, 1988; Davis, Haissig, Sankhla, 1988; Ono & Rodrigues, 1996; Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998; Pinto & Lameira, 2001; Aloufa, 2003; Oliveira *et al.*, 2003).

Dentre as técnicas moleculares para análise do DNA, o marcador molecular do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) tem sido empregado para uma grande variedade de espécies (Rout *et al.*, 1998; Piola *et al.*, 1999; Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Bittencourt, 2000; Ciampi, 2001; Sales *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2004), por fornecer um número ilimitado de marcadores altamente polimórficos que permite investigar todo o DNA genômico. É uma técnica significativamente útil, que pode ser aplicada com simplicidade e rapidez em estudos de mapeamento genético, genética de populações, sistemática molecular, “fingerprinting” de genótipos e seleção assistida por marcadores no melhoramento de plantas e animais, além de ser uma metodologia de baixo custo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Para a conservação de espécies vegetais, o estabelecimento de bancos de germoplasma *ex situ*, é uma garantia, porque permite o acesso ao material genético para caracterização, domesticação, desenvolvimento de novas variedades e prospecção de genes, além de preservar a espécie e evitar os riscos de extinção, através de uma erosão genética.

A cultura de tecidos vegetais, ou cultura *in vitro* é uma técnica que vem sendo usada amplamente para a clonagem de plantas em grande escala, bem como para a conservação de material genético sob condições de crescimento inferior, aplicada com êxito na conservação *ex situ* para um significativo número de espécies (Hoyt, 1992).

Anemopaegma arvense (Vell.) Stell. ex de Souza, *Mandevilla illustris* (Vell.) R. E. Woodson e *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson, espécies endêmicas do cerrado, foram selecionadas para serem alvos desses estudos, devido o grau de ameaça de extinção que estão expostas e pelo potencial terapêutico e econômico que representam.

Estudos farmacológicos e químicos realizados com estas espécies têm mostrado o potencial das mesmas e corroborado para o desenvolvimento de técnicas

biotecnológicas que viabilizem a produção em larga escala, podendo, desse modo, atender a demanda de matéria prima requerida pela indústria farmacêutica, bem como amenizar o problema de extinção.

Sendo assim, estudos que busquem metodologias adequadas para a produção e a conservação destes importantes genótipos com propriedades terapêuticas tornam-se fundamentais na busca de uma exploração sustentável da biodiversidade com vistas a preservação do bioma Cerrado, amenizando o risco de extinção dessas espécies.

Como as técnicas biotecnológicas podem ser alternativas viáveis para programas de conservação, os objetivos deste trabalho foram estudar a variabilidade genética em diferentes populações de *Mandevilla velutina* por meio de marcador molecular RAPD; estabelecer a conservação em bancos de germoplasma *in vitro* de diferentes genótipos de *Mandevilla velutina*; desenvolver protocolos eficientes de enraizamento *in vitro* para a produção de mudas em larga escala de *Anemopaegma arvense*, *Mandevilla illustris* e *Mandevilla velutina*; verificar a ocorrência e identificar espécies de micorrizas, avaliando a colonização por fungos micorrízicos arbusculares em raízes de plantas de diferentes populações e variedades de *Anemopaegma arvense*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas Medicinais do Cerrado

O cerrado está localizado basicamente no Planalto Central do Brasil e é o segundo maior bioma do país em área, superado somente pela Amazônia, representando 23% do território brasileiro, onde ocupa mais de 2 000 000 km². Caracteriza-se pela presença de invernos secos e verões chuvosos, com uma precipitação média anual da ordem de 1500 mm, variando de 750 a 2000 mm. Ocorre em altitudes que variam de cerca de 300 m a mais de 1600 m. Abrange os estados de Goiás, Tocantins e o Distrito Federal, parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo e também ocorre em áreas disjuntas ao norte nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima e, ao sul, em pequenas “ilhas” no Paraná. Fora do Brasil ocupa áreas na Bolívia e Paraguai, enquanto paisagens semelhantes são encontradas na Colômbia, Guiana, Suriname e Venezuela (Almeida Jr., 1993; Ribeiro & Walter, 1998; Pires, 1999; Ávila, 2001; Coutinho 2002).

É a formação savânica com maior diversidade vegetal do mundo, especialmente quando consideradas as espécies lenhosas. Tem uma posição destacada no que se refere a biodiversidade, por apresentar uma intensa heterogeneidade vegetal, sendo responsável por 5% de toda a biodiversidade mundial (Pires, 1999; Moraes, Jorge & Neto, 2003). De acordo com Mendonça *et al.*, (1998), a diversidade florística do cerrado possui

6.671 *taxa* nativos, distribuídos em 170 famílias, sendo o primeiro bioma em diversidade de quimiotipos.

O Cerrado é considerado o maior bioma em diversidade de quimiotipos porque a imensurável diversidade química encontrada nas espécies endêmicas, está relacionada à grande diversidade taxonômica que aí ocorre, relativa aos táxons mais elevados como gênero, família e espécie. Quanto maior a diversidade taxonômica em níveis superiores, maior o distanciamento filogenético entre as espécies e maior é a diferença e diversidade química entre elas (Neto & Moraes, 2003).

Este bioma se caracteriza pela sua vegetação, já que não se trata de uma cobertura vegetal uniforme. É um complexo vegetacional, diferenciado entre o estrato lenhoso, constituído de árvores e arbustos, e o herbáceo, formado por ervas e subarbustos. As espécies arbóreas são encontradas nas formações florestais; as formações savânicas, são compostas por árvores e arbustos espalhados sobre um estrato graminoso e nas formações campestres, predominam as espécies herbáceas e algumas arbustivas (Ribeiro & Walter, 1998; Correia, 1999; Coutinho, 2002).

A vegetação arbóreo arbustiva, caracteriza-se pela presença de troncos e ramos tortuosos, súber espesso e sistema subterrâneo dotado de longas raízes pivotantes, que chegam atingir de 10 a 15 m de profundidade. A vegetação herbáceo e subarbustiva é caracterizada por órgãos subterrâneos de resistência, como bulbos, xilopódio, sóboles, dentre outros, que garantem a sobrevivência durante a estação seca e as queimadas. Suas raízes são superficiais, chegando a pouco mais de 30 cm (Coutinho, 2002).

A vegetação característica deste bioma pode ser explicada pelas teorias pedológicas, onde seria dependente de aspectos edáficos e geológicos como deficiências minerais, saturação do solo por elementos como o alumínio, diferenças de drenagem e profundidade do solo, pelas teorias climáticas, onde a vegetação seria o resultado do clima, principalmente em função da limitação sazonal de água no período seco e pelas teorias bióticas, onde seria resultado da ação do homem, principalmente pelo uso freqüente do fogo, ou ainda resultante de outros agentes da biota (Ávila, 2001).

A distribuição da flora do cerrado pode ser dividida em onze tipos fitofisionômicos, agrupados de acordo com a fisionomia, composição florística e aspectos relacionados ao ambiente. Dentro das formações florestais encontram-se a Mata Ciliar, Mata

de Galeria, Mata Seca e Cerradão. As formações savânicas compreendem o Cerrado sentido restrito, Parque de Cerrado, Palmeiral e Vereda. Campo Sujo, Campo Rupestre e Campo Limpo encontram-se entre as formações campestres (Ribeiro & Walter, 1998; Felfili *et al.*, 2000; Coutinho 2002).

Outras características importantes da vegetação do cerrado, são a constituição da vegetação por espécies pirofíticas, ou seja, adaptadas a uma condição ambiental que inclui a presença de fogo, e a heterogeneidade de distribuição das espécies, visto que, há espécies mais típicas dos cerrados da região Norte, outras do Centro-Oeste, outras do Sudeste, etc; (Coutinho 2002).

Alguns estudos realizados recentemente, identificaram áreas do globo terrestre caracterizadas por excepcional concentração de espécies endêmicas e elevada degradação de habitat. Estas áreas denominadas “hotspots”, estão sendo exploradas de forma irracional pelo homem e necessitam de ações urgentes a fim de se evitar a extinção das espécies nelas existentes em um futuro próximo.

Dos 25 “hotspots” mundiais, o Cerrado foi reconhecido como área de maior risco de extinção, tendo sido apontado como um dos biomas prioritários em programas de conservação, devido o alto grau de endemismo das espécies e forte pressão antrópica, que tem levado à reduções drásticas suas populações naturais, sem que tenham sido devidamente estudadas (Reis & Mariot, 2001; Pinto *et al.*, 2002; Neto & Moraes, 2003).

A maioria das espécies medicinais encontradas no Cerrado pertencem as famílias Asteraceae, Apocynaceae, Bignoniaceae, Caesalpiniaceae, Fabaceae, Melastomataceae, Mimosaceae e Rubiaceae (Vieira & Martins, 2000; Rodrigues & Carvalho, 2001; Klein, 2002; Neto & Moraes, 2003; Durigan, *et al.*, 2004).

Vieira & Martins (2000), afirmam que as estimativas mais otimistas citam que menos de 1% da flora do cerrado já foi estudada quimicamente e ressaltam que devido a grande velocidade de extinção das espécies pela destruição dos seus ecossistemas, é provável que menos de 5% destas sejam adicionadas ao conhecimento disponível antes de serem extintas. Inúmeras espécies de uso medicinal do Cerrado encontram-se ameaçadas de extinção (Silva, 1994; Almeida *et al.*, 1998; Mendonça e Lins, 2000; Vieira & Martins, 2000; Ávila, 2001; Rodrigues & Carvalho, 2001; Souza, 2001; Brito, 2003; Neto e Moraes, 2003).

Dentre as inúmeras espécies do cerrado que apresentam propriedades terapêuticas, algumas podem ser encontradas no Apêndice 1 (Almeida *et al*, 1998; Silva, 1998; Proença *et al.*, 2000; Vieira & Martins, 2000; Rodrigues & Carvalho, 2001, Neto & Moraes, 2003; Durigan *et al.*, 2004).

2.2 Aspectos taxonômicos, descrição botânica e importância das espécies em estudo

2.2.1 *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. ex de Souza

Anemopaegma arvense possui como sinonímia *Anemopaegma mirandum* (Cham.) DC., é uma espécie medicinal conhecida popularmente como catuaba e verga-tesa. Pertencente a família Bignoniaceae, é endêmica do Cerrado brasileiro, ocorrendo mais precisamente nas fisionomias campestres, em solo de afloramento laterítico e em latossolo vermelho-amarelo. Sua distribuição está restrita ao Distrito Federal e aos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo. Sua floração ocorre de agosto a novembro, após queimadas, e excepcionalmente após chuvas inesperadas. A frutificação se dá principalmente de setembro a março. Além de medicinal, a espécie também é utilizada como ornamental, sendo os frutos e sementes empregados na confecção de arranjos artesanais (Almeida *et al.*, 1998; Durigan *et al.*, 2004).

• Descrição botânica

Subarbusto hermafrodita de até 60 cm de altura, glabrescente a pubérulo e ramos estriados (Figura 1). Suas folhas são opostas, compostas trifoliadas, curto-pecioladas a sésseis, com folíolos sésseis a subsésseis; limbo com 0,3 a 10 x 0,1 a 1,8 cm, linear a elíptico-linear; ápice obtuso a agudo; base angusta; nervação inconspícua; pseudo-estípulas foliáceas ou ausentes. Inflorescência racemo axilar ou terminal, com 1 a 4 flores. Flores com 3,5 a 4,5 x 2 cm, zigomorfas, curto-pediceladas; cálice gamossépalo, cupuliforme, truncado ou inconspicuamente 5-lobado, raramente com glândulas pateliformes; coroa campanulada, creme com tubo amarelo; estames didínamos com um estaminódio, inclusos; tecas retas, divaricadas; ovário súpero, bilocular com muitos óvulos, curto-estipitado; óvulos

2-seriados por lóculo; disco pulviniforme; estilete 1; estigma 1, bilamelado. Fruto cápsula septrífaga com 8,9 a 9,7 x 6,4 a 6,9 cm, verde-oliva claro, elíptico a orbicular, estipitado; valvas pateliformes; linha mediana fortemente impressa; sementes aladas, cremes, orbiculares; núcleo seminífero central; ala adjacente (Ferri, 1969; Almeida *et al.*, 1998; Durigan *et al.*, 2004).

• Atividade farmacológica e princípios ativos

De acordo com Hoehne (1978), os metabólitos secundários de interesse desta espécie estão localizados nas raízes ricas de matéria resinoso-balsâmica, cuja ação é estimulante e tonificante do sistema nervoso central em humanos. Informações populares indicam que folhas e raízes da catuaba são muito empregadas na forma de alcoolaturas e tinturas, além da tradicional garrafada, com propriedades afrodisíacas (Almeida *et al.*, 1998).

Atualmente, segundo a Base de Dados Tropical (2002) (BDT), a catuaba encontra-se na lista da flora ameaçada de extinção no Brasil, enquadrada na categoria vulnerável, devido a intensa exploração extrativista predatória não só pela população, mas também por laboratórios farmacêuticos.

Pereira *et al.*, (2003) estabeleceram protocolo de propagação *in vitro* para a catuaba, objetivando selecionar e conservar genótipos elites. Entretanto, o enraizamento foi insatisfatório.

Sendo assim, torna-se importante a ampliação dos estudos realizados anteriormente, objetivando estabelecer um protocolo adequado para o enraizamento *in vitro* da catuaba, para viabilizar a produção de mudas e atender a demanda de laboratórios com interesse na produção de medicamentos a partir desta espécie, e auxiliar na solução de questões relativas a extinção da mesma.



Figura 1. Aspecto geral de *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. ex de Souza

2.2.2 *Mandevilla illustris* (Vell.) R. E. Woodson

Mandevilla illustris pertencente a família Apocynaceae é uma planta medicinal conhecida popularmente como jalapa ou jalapa-do-campo, que ocorre no cerrado sentido restrito e cerrado ralo. Floresce de setembro a janeiro com pico em novembro e a frutificação se dá em fevereiro. Sua distribuição está restrita ao Distrito Federal e aos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Almeida *et al.*, 1998; Durigan *et al.*, 2004).

• Descrição botânica

Erva hemafródita, perene, de até 50 cm de altura, com caule herbáceo simples, piloso, partindo do xilopódio bem desenvolvido; albo-pilosa salvo cálice, corola e anteras; caule único ou poucos, cilíndricos; xilopódio fusiforme, muito desenvolvido; látex branco, copioso. Folhas opostas, simples, de curto-pecioladas a subsésseis; limbo com 3,5 a 9,5 x 2,5 a 6,5 cm, oblongo a obovado, cartáceo; ápice de curto-acuminado a rotundo; base de obtusa a cordada; nervação ligeiramente saliente nas duas faces, obscurecida pelo indumento; nervuras secundárias levemente ascendentes; nervuras terciárias imperceptíveis; pecíolo com até 4 mm de comprimento. Inflorescência cimera terminal com 3 a 10 flores (Figura 2). Flores com cerca de 5 cm, actinomorfas, pediceladas; cálice campanulado, com 5 lacíneos lanceolados; corola rosa escuro, infundibuliforme, com 5 lobos suborbiculares, acuminados, oblíquos; estames 5, inseridos na face da corola; filetes muito curtos; anteras extrorsas, rimosas, sagitados, os lóculos ocupando pequena porção apical da antera; ovário súpero; carpelos livres, 2, ovóides, com muitos óvulos multisseriados. Fruto folículos gêmeos com até 25 cm de comprimento, lineares; sementes numerosas, castanhas, com cerca de 5 a 10 mm de comprimento, fusiformes, coroados por denso tufo apical de pêlos de 15 a 20 mm de comprimento; pêlos claros, muito finos, com brilho sedoso (Almeida *et al.*, 1998; Koch & Kinoshita, 1999; Durigan *et al.*, 2004).

Apezato-da-Glória & Estelita, (2000), estudaram o desenvolvimento anatômico do sistema subterrâneo, chegando a conclusão que este consiste de um xilopódio cuja região basal une-se à uma raiz tuberosa.

- **Atividade farmacológica e princípios ativos**

M. illustris, além de medicinal, é utilizada como ornamental, pela disposição das folhas e beleza das flores de coloração rósea. O xilopódio é purgativo, e a casca e o látex são usados nas assepsias de úlceras e contra verrugas (Ferreira, 1980b; Barros, 1982) citados por (Almeida *et al.*, 1998).

Franzoi, *et al.*, (2003), testaram a atividade antinoceptiva de derivados do ácido caféico isolado de *M. illustris* e comprovaram a atividade antiinflamatória, analgésica, antifúngica, antibacetrano e antioxidante dessa espécie. Além disso, estudos realizados por Calixto, *et al.* (1987) também confirmam o efeito antiinflamatório e antiofídico, que foi atribuído aos compostos denominados ilustról e 2,6-dideoxy-3-O-methylpyrano-syllustrol (Yunes *et al.*, 1993; Niero *et al.*, 2002).



Figura 2. Aspecto geral de *Mandevilla illustris* (Vell.) R. E. Woodson

2.2.3 *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson

Mandevilla velutina é uma planta medicinal pertencente à família Apocynaceae, conhecida popularmente como infalível, batata-infalível, jalapa e jalapa-do-campo, que ocorre geralmente no cerrado, mais precisamente em fisionomias campestres de cerrado e cerrado típico (Almeida *et al.*, 1998; Durigan *et al.*, 2004).

• Descrição botânica

Subarbusto de 30 a 60 cm de altura, com caule herbáceo, glabro, partindo de um xilopódio bem desenvolvido (Figura 3). Folhas opostas, subsésseis, elípticas a oblanceoladas, ápice agudo a acuminado, base arredondada a subcordada, 6,5-11x1,2-2,3 cm; cartáceas; concolores; glabras; venação bronquidódroma. Inflorescência duas vezes mais longa que as folhas subtendidas, 2-9 flores; brácteas lanceoladas e ovado-lanceoladas. Flores grandes, róseas, em cimera terminal com poucas flores; com tubos mais longo e reto e lobos menores de 6-9 cm de comprimento; lacínios do cálice linear-lanceolados, glabros; coléteres alternos aos lacínios, em grupos de 4 ou 6; tubo de corola cilíndrico, mais estreito no terço inferior, 2 vezes maior que os lobos; lobos oblíquo-ovados, pouco acuminados. Folículos imaturos delgados, avermelhados. Fruto composto por dois folículos lineares, até 30 cm de comprimento. Floresce de outubro a janeiro e o início da frutificação se dá em fevereiro (Almeida *et al.*, 1998; Koch & Kinoshita, 1999; Durigan *et al.*, 2004).

Mandevilla velutina se difere da *Mandevilla illustris* pelas folhas glabras e flores mais claras e com tubo mais longo (Durigan *et al.*, 2004).

• Atividade farmacológica e princípios ativos

O interesse por esta valiosa planta medicinal do cerrado não é recente, na década de 80, inúmeros trabalhos relevantes foram publicados (Calixto *et al.*, 1985; Calixto *et al.*, 1986; Calixto *et al.*, 1987; Calixto *et al.*, 1988; Appezzato, 1988), consolidando dentre outros, os estudos atuais de conservação (Biondo, 2003).

Estudos realizados por Calixto *et al.*, (1985), mostraram o antagonismo seletivo à bradicinina partir do extrato do sistema subterrâneo. Quando os trabalhos foram realizados com o extrato aquoso da planta em tecidos animais, houve uma ação inibitória de outras cininas envolvidas na resposta inflamatória (Calixto *et al.*, 1986; Calixto *et al.*, 1987; Calixto *et al.*, 1988).

Bento *et al.*, (1996), demonstrou que a inibição da bradicinina em processos inflamatórios, estava relacionado ao triterpeno velutinol.

Nos trabalhos de propagação de *M. velutina* realizados por Apezato (1988), os resultados permitiram concluir que tanto o sistema subterrâneo quanto a parte aérea, podem ser usados para a propagação da espécie, como também a germinação de sementes é perfeitamente viável.

Atualmente é preocupante a situação envolta a preservação da espécie. Segundo Pereira *et al.*, (2002) citados por Biondo (2003), *M. velutina* é apontada como uma espécie prioritária para a conservação, por ser coletada de forma extrativista, visto que o emprego da mesma é muito comum na medicina popular, na forma de extrato alcoólico ou infusões do sistema subterrâneo, no tratamento de processos inflamatórios e acidentes com serpentes venenosas (Calixto *et al.*, 1985).

Biondo (2003), estudou a conservação *in vitro* e avaliou as propriedades antiofídicas de *M. velutina*, obtendo um protocolo para o estabelecimento *in vitro* e sua conservação em bancos de germoplasma.

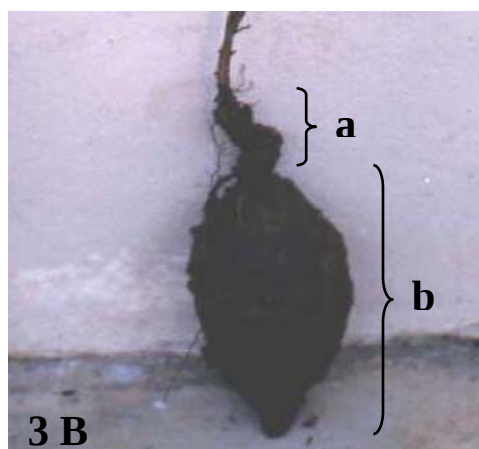


Figura 3 A e 3 B. Aspecto geral de *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson e detalhe do sistema subterrâneo (a – xilopódio b – raiz tuberosa), respectivamente (Apezzato-da-Glória & Stelita, 2000).

2.3 Conservação de recursos genéticos vegetais *in vitro*

A importância da manutenção de espécies vegetais em coleções vivas têm despertado a atenção do homem desde os primórdios da história da humanidade. Após a colheita, os agricultores já conservavam sementes, raízes ou bulbos para o plantio seguinte. A prática de manter as plantas em jardins botânicos também é muito antiga e foi uma realidade em diversos lugares, como Noruega em 1266, Veneza em 1333, Vaticano em 1447, França em 1626, Inglaterra em 1759, Brasil em 1811, dentre outros; preservando, deste modo, a diversidade genética das plantas.

Estima-se que mil espécies vegetais sejam extintas por ano no planeta (três espécies por dia) e se a destruição continuar no ritmo atual, até o ano de 2015, entre 4 a 8% de todas as espécies vivas presentes nas florestas tropicais podem desaparecer; muitas sem nem mesmo terem sido descritas, catalogadas ou estudadas (Sandes e Di Blasi, 2000).

Neste contexto, alternativas que permitam a conservação e a preservação das espécies vegetais e dos ecossistemas, tornam-se primordiais a nível mundial, de modo que assegure a existência e a disponibilidade dos recursos genéticos. De acordo com Nass (2001), a conservação da biodiversidade não deve resumir-se à proteção da natureza frente ao desenvolvimento, mas procurar também, satisfazer a demanda humana por recursos biológicos e, simultaneamente, garantir a sustentabilidade a longo prazo da riqueza biótica do planeta.

A conservação de recursos genéticos, por meio da manutenção de coleções de germoplasma, é uma realidade em vários países, através do estabelecimento de bancos de germoplasma.

De acordo com Freire *et al.*, (1999) e Silva (2001), o termo germoplasma refere-se ao material que constitui a base física da herança que se transmite de uma geração para outra através de células reprodutivas. É usado para definir um indivíduo, ou clone, representando um tipo, espécie ou cultura, passível de ser mantido em um repositório. A denominação banco de germoplasma tem sido adotada para indicar a estrutura ou local do sistema de recursos genéticos onde o germoplasma é conservado

O estabelecimento de bancos de germoplasma para a conservação de espécies vegetais, é uma garantia, porque permite o acesso ao material genético para

caracterização, domesticação, desenvolvimento de novas variedades e prospecção de genes, além de conservar a espécie protegendo-a da erosão genética. O banco de germoplasma, deve portanto, reunir genótipos de muitas procedências diferentes (Freire *et al.*, 1999).

Para a conservação de espécies medicinais e aromáticas, a existência e reconhecimento de raças químicas ou quimiotipos é muito importante. Segundo Vieira (2000), é fundamental que a conservação de recursos genéticos dessas espécies, tenham como base uma coleta de germoplasma que amostrasse as diferentes raças químicas existentes, permitindo ao usuário deste material genético, acesso a uma maior variabilidade.

Entretanto, nem todas as espécies tidas como medicinais da flora brasileira possuem seus compostos ativos determinados, o que torna difícil a ação de conservação de seu germoplasma, no que se refere ao reconhecimento de raças químicas.

Nesse caso, um dos principais aspectos a se considerar na conservação de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas é que este é um processo de longo prazo, que deve possibilitar a utilização de germoplasma por diversos pesquisadores e instituições. Um fator importante na conservação de espécies medicinais e aromáticas é a aplicação de uma metodologia que leve em consideração a ampla diversidade deste numeroso grupo de espécies (Vieira, 2002; Vieira e Alves, 2003).

Técnicas de biologia molecular têm sido amplamente empregadas neste contexto para investigar a variabilidade genética de espécies silvestres e domesticadas conservadas em banco de germoplasma. Neste caso, o uso de marcadores moleculares podem auxiliar na diferenciação da variação dentro e entre populações (Vieira, 2002).

A conservação de plantas pode ser realizada *ex situ*, ou seja, as plantas são conservadas fora do seu habitat natural, e *in situ*, cuja conservação é realizada dentro do habitat natural (Hoyt, 1992; Freire *et al.*, 1999; Vieira, 2000; Borém, 2001; Brito, 2003).

A conservação da variabilidade genética do germoplasma *ex situ*, pode ser realizada a médio ou longo prazo, mas representa um permanente desafio no sentido de evitar alterações genéticas na amostra populacional submetida à paralisação do processo evolutivo que atuava sobre a respectiva população no momento da amostragem. Quando a conservação dos acessos é realizada em reservas genéticas *in situ*, o processo evolutivo continua e, em decorrência, novas formas de variação genética podem ocorrer (Freire *et al.*, 1999).

Segundo Vieira e Alves (2003), a conservação de germoplasma de espécies medicinais e aromáticas em uma rede de coleções e bancos de germoplasma *in situ*, permitirá enfrentar e responder aos desafios futuros, fornecendo material genético para domesticação, caracterização, desenvolvimento de variedades, prospecção de genes e contribuir para o conhecimento do metabolismo secundário dessas espécies.

No entanto, a maior parte das culturas são conservadas *ex situ*, em ambiente artificial por meio de sementes, plantas, partes das plantas, tecidos ou células. Embora o armazenamento possa ser a longo prazo, as plantas devem ser propagadas à medida que atingem a maturidade. As sementes e os tecidos devem periodicamente desenvolver-se para formarem plantas completas, e então, novas sementes ou tecidos devem ser obtidos para armazenamento (Hoyt, 1992).

Se a regeneração é feita regular e cuidadosamente, a conservação *ex situ* pode ser uma forma segura de conservar genes por séculos e também é uma forma conveniente porque permite que em apenas um local seja reunido germoplasma de muitas procedências diferentes. Porém a centralização também apresenta riscos e os bancos de germoplasma, com grande coleções em um pequeno espaço, podem ser vulneráveis a muitos fatores. Neste caso, sempre que possível, as amostras devem ser conservadas em mais de um banco de germoplasma (Hoyt, 1992).

Existem três métodos de conservação *ex situ*: banco de sementes, bancos de germoplasma *in vivo* e cultura de tecidos.

A cultura de tecidos vegetais, ou cultura *in vitro* é usada amplamente para propagação de plantas na horticultura, sendo muito apropriada para a clonagem em grande escala de uma única espécie ou cultivar, bem como para a conservação de material genético sob condições de crescimento retardado. É uma técnica que tem sido aplicada com êxito na conservação *ex situ* para um significativo número de espécies. Porém, cada espécie requer técnicas especialmente formuladas.

A manutenção *in vitro* do germoplasma, pode ser realizada através de ápices caulinares, embriões zigóticos e/ou somáticos, plântulas, ou até mesmo calos (Ferreira *et al.*, 1998).

Dentre as vantagens associadas a preservação *in vitro* citam-se: pequeno espaço para manutenção de grande número de acessos, manutenção de acessos livres

de pragas e doenças, não requerimento de podas, potencial para rápida produção de grande número de plantas (Borém, 2001).

Para plantas que não produzem sementes, como é o caso de espécies propagadas por bulbos ou rizomas, a cultura *in vitro* é preferencialmente a única opção. Têm-se desenvolvido técnicas satisfatórias de armazenamento *in vitro* para batata, batata-doce e algumas fruteiras de zonas temperadas (Hoyt, 1992).

À medida em que este método é aprimorado, está sendo cada vez mais utilizado para plantas que produzem sementes e para conservação de materiais coletados no campo em fase estéril, bem como para espécies recalcitrantes (Borém, 2001).

De acordo com Withers & Williams (1998) o estabelecimento e a manutenção de culturas *in vitro* por períodos prolongados e/ou por períodos muito curtos, podem envolver riscos que levem a perda do material. Geralmente, na conservação a curto e médio prazos, o material armazenado é subcultivado em intervalos regulares de seis meses, pois a manipulação das plântulas deve ser mínima a fim de reduzir o risco de contaminação.

O objetivo do armazenamento do germoplasma, a curto e médio prazos, é definir condições experimentais favoráveis a um crescimento mínimo sem alteração da estabilidade genética, e isto pode ser conseguido através da redução da temperatura e/ou intensidade luminosa, diluição dos elementos nutritivos no meio de cultura e pela aplicação de agentes químicos, osmóticos e hormonais no meio, capazes de inibir o crescimento do material em cultivo (Withers & Williams, 1998; Borém, 2001).

Para a conservação de germoplasma a médio prazo, os acessos devem ser avaliados quanto ao nível de variabilidade genética, pois o procedimento de conservação *in vitro* é oneroso e a manutenção de amostras geneticamente similares ou muito próximas, precisa ser evitada. Outras questões importantes estão relacionadas ao conhecimento da biologia, fisiologia e ambiente de origem da espécie, o que, de modo geral, auxilia na determinação de condições adequadas da conservação *in vitro* a médio prazo, minimizando os custos do estabelecimento do banco de germoplasma (Lata, 1991).

Segundo Villalobos & Engelman (1995), desde 1960, houve um crescimento significativo do número de coleções *in vitro* para preservação de plantas e subsequente melhoramento genético. De acordo com a FAO (Food and Agriculture Organization), no ano de 1994 havia 4.410.000 acessos conservados *in vitro*, sendo 50% do

total conservado por países industrializados, 38% por países em desenvolvimento e 12% por grupos independentes (Anaon, 1994).

No Brasil, dentre as instituições que conservam germoplasma em condições *in vitro*, encontram-se a Embrapa Recursos Genéticos, a Embrapa Mandioca e Fruticultura, a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) e a Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). A mandioca, o cacau, e algumas espécies medicinais como *Stryphnodendron adstringens*, *Mandevilla velutina*, *Anemopaegma arvense*, *Lychnophora ericoides*, *Zeyheria montana*, *Jacarada decurrens*, *Pfaffia glomerata*, são exemplos de espécies conservadas nestas condições.

Tendo em vista o quadro atual quanto à velocidade de extinção de determinadas espécies medicinais nativas, a sua conservação sob condições *in vitro* é uma alternativa viável, no sentido de proteger a biodiversidade brasileira e servir como fonte de matéria prima para a indústria brasileira de fitoterápicos.

No entanto, de acordo com Hoyt (1992), trabalhos adicionais ainda são necessários para aumentar o conhecimento sobre os efeitos genéticos do armazenamento de plantas através da cultura de tecidos. É necessário também que se aprimorem as técnicas de recuperação de plantas completas a partir destas culturas. Contudo, para espécies cuja conservação por sementes não é possível, este método já é uma alternativa realizada com êxito.

2.4 Marcadores moleculares

Os marcadores morfológicos foram os primeiros a serem utilizados em estudos genéticos, para a identificação de espécies e cultivares. No entanto, esses caracteres constituem uma base pobre para estudos de variabilidade genética, por ser uma medida indireta da composição do DNA do material estudado.

Desse modo, o estudo da diversidade a nível de DNA em espécies vegetais, tornou-se o principal enfoque em pesquisas de biodiversidade molecular. Além de permitir a detecção da variabilidade genética entre dois ou mais indivíduos, populações ou espécies diferentes, os métodos moleculares apresentam melhor poder discriminatório e medem a composição genética mais diretamente quando comparados aos métodos

morfológicos, sendo portanto, mais indicados para estudos que envolvem a variabilidade gênica (Solé-Cava, 2001; Binneck *et al.*, 2002).

Várias técnicas de marcadores moleculares estão disponíveis e vêm sendo usadas de modo significativo em estudos de melhoramento genético e programas de conservação, o que tem possibilitado o estabelecimento de bancos de germoplasma *ex situ* a fim de se conservar as espécies vegetais nativas que se encontram em risco de extinção.

Segundo Milach (1998), os marcadores moleculares surgiram em razão da necessidade da detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA, eliminando a influência do ambiente, e podem ser definidos como qualquer fenótipo oriundo de um gene ou de um segmento específico de DNA expresso (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Borém, 2001).

Atualmente, têm sido usados para detecção de genes associados a estresses bióticos e abióticos; avaliação e caracterização de germoplasma; estudos de variabilidade e diversidade genética; introgressão gênica e seleção assistida por marcadores; desenvolvimento de mapas genéticos; determinação de grupos heteróticos e associação com regiões genômicas que afetam a heterose, teste de pureza genética; seleção de resistência a patógenos exóticos ainda quantitativos; estudos de interação genótipo-ambiente; entre outros (Brammer & Milach, 2002).

Os marcadores genéticos podem ser divididos em dois grupos: hibridização e amplificação de DNA. Entre os primeiros, estão os marcadores RFLP, que foi o primeiro a surgir e se baseava no uso de enzimas de restrição, os minissatélites ou locos VNTR. Entre os segundos, estão os marcadores do tipo RAPD, SCAR, STS ou SSR, AFLP e microsatélites. A classe de marcadores identificados por amplificação de DNA está baseada na reação em cadeia da polimerase ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que surgiu em meados da década de 80 e permitiu o desenvolvimento de outras técnicas moleculares (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998; Arias & Infante-Malachias, 2001; Borém, 2001; Matioli, 2001; Brammer & Milach, 2002).

A técnica de PCR causou uma verdadeira revolução na biologia, porque possibilitou um significativo avanço nos estudos de melhoramento genético, por permitir ampliar pequenas seqüências específicas de nucleotídeos em quantidades acessíveis à análise genética, a partir de ínfima quantidade de DNA. Baseia-se na síntese enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA na presença de enzima DNA polimerase e de

oligonucleotídeos iniciadores ou primers, que delimitam a sequência de DNA de fita dupla a ser amplificada, cujos resultados são milhões de cópias idênticas, que formam bandas perfeitamente visíveis (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Brammer & Milach, 2002).

O polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, ou RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é uma derivação da técnica de PCR, criada por Williams (1990), que oferece a oportunidade de gerar grande quantidade de polimorfismo de fragmentos de DNA, espalhados por todo o genoma, não requerendo o conhecimento prévio da sequência do DNA-alvo, nem de primers espécie-específicos. É uma técnica que envolve a amplificação simultânea de vários loci anônimos no genoma, utilizando *primers* de sequência arbitrária para iniciar a reação de amplificação (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Os marcadores RAPD têm sido usados em estudos para construção de mapas genéticos, estimativa de variabilidade genética e identificação de alelos favoráveis. O fornecimento de informações sobre a variabilidade genética de populações, níveis de similaridade entre e dentro das mesmas, possibilita que se faça inferências sobre o relacionamento entre populações naturais e também aquelas mantidas em instituições como fonte de germoplasma (Gunter *et al.*, 1996).

A vantagem da técnica de marcadores RAPD é a sua capacidade de detectar polimorfismo de modo simples e rápido, permitindo que possam ser usados fingerprinting, distinguindo divergências mínimas entre espécies ou clones ou entre esses, além de ser de baixo custo. A principal limitação, além da baixa reprodutibilidade, é o baixo conteúdo de informação genética por loco, por tratar-se de um marcador dominante, ou seja, apenas um alelo é detectado no segmento que é amplificado (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998; Arias & Infante-Malachias, 2001; Borém, 2001; Matioli, 2001; Brammer & Milach, 2002).

Para Moura (2003), a análise da estrutura e diversidade em populações naturais com marcadores RAPD sofre algumas limitações no que diz respeito a estimar a diversidade genética, as frequências genotípicas e as taxas de endogamia, devido à sua natureza dominante. Para se obter tais resultados, torna-se necessário pressupor que as populações estejam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Todavia, em estudos realizados com espécies pouco estudadas em nível molecular, como as medicinais nativas e/ou exóticas, a aplicação da técnica de RAPD, tem

permitido a obtenção de resultados significativamente satisfatórios em análises de variabilidade genética de populações, permitido o estabelecimento de estratégias em programas de conservação (Wallner *et al.*, 1996; Milach, 1998; Rout *et al.*, 1998; Gauer e Cavalli-Molina, 2000; Bittencourt, 2000; Arnholdt-Schmitt, 2000; Sales *et al.*, 2001; Bertoni, 2003; Biondo, 2003; Zimback, 2004; Batistini, 2006).

2.5 Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*

Com o advento da biotecnologia, a técnica de micropropagação teve um forte impacto sobre a produção de plantas em larga escala e centenas de protocolos foram estabelecidos visando a produção comercial de mudas, como também a preservação de espécies vegetais ameaçadas de extinção.

Uma das etapas que pode dificultar o estabelecimento de um protocolo de micropropagação é o enraizamento. O desenvolvimento do sistema radicular a partir da formação de raízes adventícias em plantas propagadas vegetativamente sob condição *in vitro* ou *in vivo*, é um processo de grande complexidade envolvendo fatores endógenos e exógenos que ainda não estão completamente elucidados.

De acordo com Filho (1993), raízes adventícias são aquelas que não se originam da radícula do embrião ou da raiz principal por ela formada. Podem formar-se nas partes aéreas das plantas, em caules subterrâneos, em hipocótilos de plantas jovens e no mesocótilo de sementes de gramíneas. Sua origem e desenvolvimento são geralmente endógenas. Entretanto, existem raízes adventícias que se formam na epiderme, junto com o tecido cortical e nas células de parênquima das margens de folhas de pecíolos (Filho, 1993; Ono & Rodrigues, 1996). Em plantas cultivadas *in vitro*, as raízes adventícias podem ser formadas, na fase de multiplicação, a partir de células de parênquima localizadas nas partes aéreas. Nessa condição a rizogênese pode ocorrer de modo direto ou indireto a partir de calos. (Filho, 1993; Grattapaglia & Machado, 1998).

Os estudos sobre enraizamento adventício tiveram grande avanço a partir do ano de 1928, com a identificação do primeiro fitohormônio de ocorrência natural: a auxina ácido 3-indolacético (IAA). Posteriormente, em 1935, auxinas sintéticas análogas ao

IAA, como os ácidos indolbutírico (IBA) e naftaleno-acético (NAA) foram preconizados como fitorreguladores de enraizamento. Além das auxinas, outras substâncias também foram avaliadas e apontadas como importantes para o enraizamento, como por exemplo as vitaminas do grupo B1 efetivas no crescimento de raízes induzidas *in vitro* (White, 1937).

O processo de formação de raiz adventícia ocorre de uma a três semanas e pode ser dividido em três fases: indução, iniciação e alongamento. As fases de indução e iniciação, geralmente são dependentes de auxina, mas o crescimento (alongamento) das raízes pode ser inibido pela presença dessa classe de substâncias (Ono & Rodrigues, 1996; McCown, 1988; Grattapaglia & Machado, 1998).

Entre os principais fatores relacionados ao enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*, encontram-se os níveis de auxina endógena, as condições inerentes a planta matriz como juvenilidade e genótipo, dentre outros, o meio de cultura, a presença de reguladores de crescimento e carboidratos, a nutrição mineral, a presença de poliaminas e substâncias como carvão ativado e compostos fenólicos, as condições ambientais de crescimento das plântulas *in vitro*, dentre outros.

2.5.1 Níveis de auxina endógena

Na fase de indução e iniciação, o processo é regulado pela relação quantitativa entre os níveis de auxina e citocinina, como também pela participação de outras substâncias. O IAA endógeno age como um ativador de gene alavancando a formação precoce do primórdio radicular e a aplicação de auxinas sintéticas favorece a conjugação entre o IAA endógeno e aminoácidos que promovem a síntese de proteínas específicas necessárias para a formação de raízes iniciais (Ono & Rodrigues, 1996; Gaspar & Hofinger, 1988; Assis & Teixeira, 1998; Aloufa, 2003).

O alto nível de auxinas endógenas pode ser necessário para a iniciação de raízes adventícias primordiais. Existe uma relação intrínseca entre os níveis de auxina endógena e a habilidade para iniciar raízes. Em geral, após aplicação da auxina sintética, ocorre um aumento imediato no nível endógeno de auxina natural e conseqüentemente há o início da formação de raízes primordiais (Gaspar & Hofinger, 1988). A ação das auxinas ocorre, inicialmente, em nível celular nos meristemas primário e secundário, estimulando a

divisão celular e o subsequente alongamento das células, sendo que, essa ação inicial das auxinas culmina com a formação das raízes (Ford *et al.*, 2001). Estes autores mostraram que algumas espécies quando são expostas a ação de auxina exógena têm o nível de IAA endógeno elevado mas, que este decresce antes da formação das raízes, o que dificulta ou impossibilita o enraizamento.

Questões diretamente ligadas ao transporte de auxinas também podem ser relevantes para o estudo de enraizamento *in vitro*, visto que existe uma relação entre aplicação de auxina exógena, ação e concentração de auxina endógena no local de formação das raízes (Ford *et al.*, 2001).

Estudos realizados por Ford *et al.*, (2001), demonstraram a importância do transporte basipetal de IAA endógeno e sua relação com a aplicação de auxina exógena, para o enraizamento adventício. As auxinas exógenas quando aplicadas na base da estaca são translocadas para diferentes órgãos da planta, e posteriormente re-transportada para a base da mesma. Quando a auxina é aplicada na base da estaca, ela é rapidamente transportada pela corrente de transpiração até as folhas, onde exerce a função de ativar maior produção de IAA, que posteriormente será transportado até a região de iniciação radicular.

Em espécies mais difíceis de enraizar, como as espécies lenhosas, o IAA endógeno pode ser metabolizado mais rapidamente no centro de produção, quando comparados às espécies de mais fácil enraizamento, resultando em uma baixa concentração de IAA livre para ser transportado para a base das estacas onde ocorrerá o enraizamento. Além disso, as células localizadas na base das estacas de espécies lenhosas que estariam mais aptas a se desdiferenciar e se transformarem em raízes adventícias, podem estar menos sensíveis às auxinas ou menos competentes para essa rediferenciação (Ono & Rodrigues, 1996; Ford *et al.*, 2001).

A relação existente entre aplicação de auxina exógena e concentração da auxina endógena, também pode estar relacionada com atividades enzimáticas, tendo em vista sua ação na regulação da concentração endógena de determinadas substâncias vegetais. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a atividade IAA-oxidase/peroxidase é responsável pela regulação do nível endógeno de auxina e os tecidos responsáveis pela formação de raiz são ricos em peroxidases.

Durante a fase de iniciação do primórdio radicular, a auxina é ativa em decorrência da ativação do sistema IAA-oxidase, entretanto, esta atividade diminui com o transcorrer das fases de crescimento das raízes, período em que a auxina é inativa. A sensibilidade dos tecidos na fase de iniciação dos primórdios radiculares parece estar relacionada com essa alta atividade, pois o IAA endógeno é oxidado pelo sistema IAA oxidase, e a adição de auxina exógena torna-se favorável ao processo de formação das raízes (Ono & Rodrigues, 1996).

A atividade de peroxidases no enraizamento adventício foi estudada por Syros *et al.*, (2004) para a espécie *Ebenus cretica* L.. Eles observaram variações na atividade desta enzima de acordo com os tratamentos de auxinas aplicados nos diferentes genótipos estudados. Foi observado um aumento na atividade enzimática durante a fase de iniciação radicular, porém, quando os explantes foram tratados com IBA, notou-se um decréscimo desta enzima. Eles constataram diferenças significativas nas estruturas anatômicas, conteúdo de lignina e atividade de peroxidases entre genótipos de fácil e de difícil enraizamento.

Para o completo estabelecimento do protocolo de micropropagação, é necessário focar alguns aspectos relacionadas a planta matriz como o estágio de desenvolvimento, o genótipo, as condições de estresse que a planta está submetida, o crescimento da planta em relação a luminosidade, a presença de substâncias nitrogenadas, compostos fenólicos, substâncias de reserva como carboidratos, a nutrição mineral, dentre outros. São esses fatores associados ou não que favorecerão o sucesso do processo de rizogênese *in vitro* (Davis, Haissig, Sankhla, 1988; Ono & Rodrigues, 1996; Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998; Aloufa, 2003; Oliveira *et al.*, 2003).

2.5.2 Juvenilidade

A capacidade de enraizamento adventício *in vitro* de espécies herbáceas e lenhosas é muito diferenciada. A grande maioria das espécies herbáceas não apresenta dificuldades quanto ao enraizamento, mas o mesmo não ocorre com espécies lenhosas (McCown, 1988; Hackett, 1988; Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998; Ford *et al.*, 2001; Horváth *et al.*, 2001; Aloufa, 2003).

Nas espécies lenhosas, embora haja trabalhos mostrando que muitas não apresentam dificuldade de enraizarem, como por exemplo algumas importantes espécies brasileiras como o mogno, a aroeira e a sangra d'água, os aspectos relacionados ao estágio de desenvolvimento como maturação, vigor vegetativo e mudanças fisiológicas podem interferir de modo significativo no enraizamento (Andrade *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2001; Bonilla, 2002; Aloufa, 2003; Tchoundjeu *et al.*, 2004; Lima, 2004).

Segundo Hackett (1988), a habilidade de enraizamento em explantes de espécies lenhosas declinam com a maturidade e de acordo com Rotundo (1993), isso ocorre porque há significativas alterações na capacidade morfogenética dos tecidos quando as espécies lenhosas passam do estado juvenil para o estado adulto.

A dificuldade de enraizamento de espécies lenhosas, relacionada a maturidade da planta, pode ser em parte resolvida no processo da micropropagação pelas contínuas subculturas que promovem o rejuvenescimento dos tecidos, o que aumenta a capacidade de enraizamento (McCown, 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001).

A influência benéfica do número de subculturas sobre o enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus* sp tem sido relatada por alguns autores. Nos estudos realizados com *Eucalyptus citriodora*, baixa porcentagem de enraizamento (35%), foi obtida após 4 subculturas. O aumento para 8 subculturas atingiu 40% e cerca de 70 a 80% após 12 subculturas (Rotundo, 1993; Grattapaglia & Machado, 1998).

Trabalhos relatados por Hackett (1988), também demonstraram um aumento no potencial de enraizamento em algumas cultivares de maçã, ameixa, pêra e eucalipto. Segundo este autor, a ocorrência de mudanças morfológicas, bioquímicas e anatômicas relacionadas a juvenilidade estão associadas com o aumento do número de subculturas.

No entanto, há espécies lenhosas cuja dificuldade de enraizamento não está relacionada a questão da maturidade da planta e portanto mesmo que se faça elevados números de subculturas, o enraizamento não ocorre (McCown, 1988). A influência da juvenilidade sobre o enraizamento adventício da arbórea *Quercus robur* foi estudada por Pierik *et al.*, (1997). Estes autores utilizaram brotos juvenis e adultos de diferentes genótipos, ambos cultivados em casa de vegetação e subcultivados *in vitro*. Eles observaram que as

subculturas não foram eficientes para promover o enraizamento adventício, visto que este ocorreu somente em explantes não lenhosos (suculentos) e brotos jovens.

2.5.3 Genótipo

Além da juvenilidade, o genótipo da planta também influencia no enraizamento e muitos trabalhos têm sido realizados mostrando que fatores genéticos estão ligados direta ou indiretamente à capacidade de determinadas espécies formar ou não raízes adventícias (Haissig & Riemenschneider, 1988; Yepes & Aldwinckle, 1994; Assis & Teixeira, 1998; Syros *et al.*, 2004).

Bordón *et al.*, (2000) estudaram o enraizamento *in vitro* de diferentes espécies de *citrus* sp., e observaram que o enraizamento não ocorreu de modo homogêneo nas espécies estudadas.

Algumas diferenças relacionadas a indução de raízes adventícias *in vitro* e genótipo também foram observadas por Cuenca & Amo-Marco (2000), quando estudaram a micropropagação de *Salvia valentina* e *S. blancoana*. O uso de diferentes concentrações de NAA, IAA e IBA resultaram em significativa diferença quanto a porcentagem de enraizamento, número e comprimento das raízes entre as duas espécies. *S. valentina* foi mais sensível ao NAA, visto que maiores concentrações inibiram a formação de raízes, o que não ocorreu com *S. blancoana*.

O efeito de auxinas no enraizamento *in vitro* de diferentes genótipos de *Grevillea* foi estudado por Leonardi *et al.*, (2001). As respostas quanto ao enraizamento foram diferentes entre *Grevillea rosmarinifolia* e *G. semperflorens* para o tipo e a concentração de auxina testada. A suplementação de auxina no meio de cultura foi essencial para o enraizamento de *G. rosmarinifolia*, e menos importante para *G. semperflorens*. A auxina NAA foi mais eficiente para *G. rosmarinifolia* quanto a porcentagem de enraizamento, número e comprimento das raízes, enquanto que para *G. semperflorens* o IBA permitiu a obtenção de melhores resultados para as mesmas características avaliadas.

Diferenças no potencial de enraizamento também podem ser observadas dentro de indivíduos de uma mesma espécie. Yepes & Aldwinckle (1994)

estudaram a micropropagação de treze cultivares de *Malus* e observaram que a concentração ótima de IBA x porcentagem de enraizamento variou de acordo com cada cultivar utilizada.

Quando Polanco & Ruiz (2001) estudaram a indução de raízes adventícias *in vitro* de quatro cultivares de *Lens culinaris*, observaram significativa diferença na porcentagem de enraizamento de acordo com os diferentes genótipos. Resultados semelhantes foram obtido por Pierik *et al.*, (1997) com diversos genótipos de *Quercus robur* e por Rogalski *et al.*, (2003) com diferentes porta-enxertos de *Prunus*.

2.5.4 Qualidade das plântulas cultivadas *in vitro*

A qualidade das plântulas cultivadas *in vitro* é influenciada pelas fases de isolamento e estabilização dos explantes. Durante a fase de estabilização *in vitro*, ocorrem algumas mudanças anatômicas e fisiológicas nas plântulas que têm sido reconhecidas como favorável ao enraizamento. As mudanças anatômicas benéficas ocorridas na zona de enraizamento podem estar relacionadas com a estiolação dos brotos, maior comprimento internodal, tecidos mais tenros e um decréscimo na formação dos tecidos mecânicos. Mudanças ocorridas na fisiologia dos brotos associadas com a estiolação do caule, geralmente induzem um aumento na habilidade de formar raízes adventícias, o que geralmente está relacionado ao transporte de auxinas, à sensibilidade dos tecidos à auxinas e a presença e atividade de metabólitos secundários (Maynard & Bassuk, 1988; McCown, 1988).

Plântulas conduzidas ao enraizamento com reduzido número de folhas e pouco alongadas não enraízam bem (Grattapaglia & Machado, 1998). Alguns autores ressaltam que o comprimento ideal da plântula é em torno de 1,0 cm e a presença de folhas é importante, considerando que estas são fundamentais na produção de auxinas, nutrientes, sacarose ou compostos nitrogenados necessários para a formação de raízes (McCown, 1988; Ono & Rodrigues, 1996; Bachelard & Stowe, 1962 citados por Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998; Pinto & Lameira, 2001).

Tendo em vista a complexidade dos fatores envolvidos no enraizamento adventício *in vitro*, fatores relacionados ao meio de cultura precisam ser amplamente estudados.

2.5.5 Meio de cultura

Quanto ao estado físico do meio de cultura, tem-se observado que algumas espécies podem estabelecer um sistema radicular mais vigoroso, quando cultivadas em meio líquido com alguma fonte de aeração, como pontes de papel ou meio sob agitação. Trabalhos relatados por Yepes & Aldwinckle (1994) e Aloufa (2003) com diferentes cultivares de *Malus* sp e por Ebrahim *et al.*, (2000) com *Maranta leuconeura* são exemplos importantes de sucesso de enraizamento em meio líquido.

Embora o meio líquido interfira positivamente na disponibilidade de água, nutrientes, reguladores vegetais e níveis de oxigênio, a grande maioria dos protocolos de micropropagação são estabelecidos em meio de cultura semi sólido (Grattapaglia & Machado, 1998; Pereira, 1999; Cerqueira, 1999; Bertolucci, 2000; Bonilla, 2002; Souza, 2003; Kadota & Niimi 2004).

Quando a utilização de meios semi-sólidos é indicada, a concentração da substância geleificante empregada, deve ser consideravelmente baixa, entre 0,2 a 0,4 % (Yepes & Aldwinckle, 1994; Grattapaglia & Machado, 1998; Aloufa, 2003). Segundo McCown (1988), o ágar pode ter um efeito inibitório sobre a indução de raízes adventícias *in vitro*, sendo as causas exatas não conhecidas.

A influência da composição dos meios de cultura no processo de enraizamento adventício *in vitro*, está relacionada a concentração de sais minerais empregados no preparo do mesmo e a presença de reguladores vegetais.

De modo geral, o uso de meios menos concentrados tem permitido melhores resultados no enraizamento de plântulas *in vitro* (McCown, 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Pinto & Lameira, 2001; Pasqual, 2001; Aloufa, 2003; Souza *et al.*, 2004; Lima, 2004).

A alta concentração de sais, que compõem o meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962), mesmo em presença de auxinas, pode inibir o enraizamento *in vitro* (McCown, 1988). Diluições deste, para ½, 1/3 e até ¼ de sais, tem possibilitado melhores resultados para muitas espécies de plantas. Meios básicos menos concentrados como WPM, White, Knop, Heller podem ser igualmente favoráveis ao enraizamento (Grattapaglia & Machado, 1998; Pinto & Lameira, 2001; Pasqual, 2001; Aloufa, 2003).

Protocolo de enraizamento *in vitro* de porta enxerto de macieira ‘Marubakaido’ foi desenvolvido em meio MS sólido com a metade da concentração dos sais, o mesmo foi obtido com as espécies *Rotula aquática*, *Hypericum perforatum* e *Saussurea obvallata*, *Malus domestica*, *Cuminum cyminum*, *Eclipta alba* e *Eupatorium adenophorum* (Centellas *et al.*, 1999; Borthakur *et al.*, 2000; Preto & Santarém, 2000; Hoffmann *et al.*, 2001; Tawfik & Noga; 2001; Joshi & Dhar, 2003; Martin, 2003).

O emprego de meio MS/4 tem possibilitado a obtenção de resultados satisfatórios na indução de raízes adventícias *in vitro* para um significativo número de espécies, como pode ser observado nos trabalhos realizados com *Azadirachta indica*, *Hemidesmus indicus*, *Bauhinia vahlii*, *Adenophora triphylla*, *Lychnophora pinaster*, dentre outras (Sreekumar, *et al.*, 2000; Bhatt & Dhar, 2000; Chen *et al.*, 2001; Rakhi Chaturvedi *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2004).

O pH do meio de cultura também pode ter ou não grande influência no enraizamento *in vitro*; mas isso depende da espécie em estudo (Ebrahim *et al.*, 2000). A grande maioria dos protocolos de enraizamento *in vitro* são desenvolvidos com a faixa de pH entre 5,0 e 6,0 (Grattapaglia & Machado, 1998; Aloufa, 2003). Entretanto, alguns trabalhos mostram que pH ainda mais baixos, na faixa de 4,8 a 3,5 podem ser indicados para enraizamento de determinadas espécies como *Brosimum gaudichaudii* (Fidélis *et al.*, 2000).

2.5.6 Reguladores vegetais

Como discutido anteriormente, sabe-se que um dos fatores mais importantes relacionados ao processo de formação de raízes adventícias *in vitro* é inerente à presença e/ou ausência de auxina. Vários autores confirmam o seu fundamental papel no processo de rizogênese (Gaspar & Hofinger, 1988; Blazich, 1988; Davis & Sankhla, 1988; McCown, 1988; Ono & Rodrigues, 1996; Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998; Margara, 1988 citado por Hoffmann, 1999; Ford, 2001; Pasqual, 2001; Lopes *et al.*, 2001; Sankhla & Upadhyaya, 1988 e Scott, 1972 citados por Aloufa, 2003; Oliveira *et al.*, 2003).

A suplementação de auxinas ao meio de enraizamento é usual. Entretanto, há espécies que enraízam com facilidade e não necessitam da presença destes

reguladores, o que pode ser explicado pelos elevados níveis endógenos desses fitohormônios (Grattapaglia & Machado, 1998; Pinto & Lameira, 2001).

Plantas como *Dianthus caryophyllus*, *Lippia alba*, *Coleus forskohlii*, *Tournefortia paniculata*, *Pothomorphe umbellata*, *Artocarpus atilis* e *Phyllanthus caroliniensis* apresentam elevado índice de enraizamento em meio de cultura isento de auxina (Cuzzuol *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 2001; Bertolucci *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2000; Rouse-Miller & Duncan, 2000; Catapan *et al.*, 2000; Reddy *et al.*, 2001).

Do mesmo modo que existe um significativo número de espécies que enraízam sem necessidade de auxina no meio de cultura, existem também aquelas que apresentam um aumento considerável na porcentagem de enraizamento quando o meio é suplementado com esta classe de regulador.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), as auxinas estão presentes em mais de 80% dos meios de enraizamento, podendo ser adicionadas sozinhas ou em combinação. Entretanto, o tipo e a concentração empregada são as variáveis que mais influenciam o processo. De acordo com Aloufa (2003), as auxinas utilizadas de modo isolado ou associadas com citocininas, giberelinas como o GA₃, ácido abscísico (ABA) e fenólicos mostram seus efeitos principalmente durante a indução e iniciação de raiz.

Para algumas espécies como a *Salvia fruticosa*, *Rudgea viburnoides* e *Bixa orellana* a utilização de auxina não associada a outras auxinas ou reguladores, favorece o enraizamento (Almeida *et al.*, 1995; Bonilla, 2002; Arikat *et al.*, 2004), enquanto que para outras plantas, como por exemplo a *Symonanthus bancroftii*, enraízam melhor quando cultivadas em meio contendo associação de auxinas (Panaia *et al.*, 2000).

As auxinas mais comuns empregadas nos meios de enraizamento são o NAA, o IBA e o IAA. A diferença entre elas, além da parte estrutural da molécula, é a estabilidade que decresce respectivamente. Sendo assim, a maior parte dos trabalhos de enraizamento *in vitro*, utilizam as auxinas NAA e IBA. Outras auxinas também têm sido utilizadas em trabalhos de enraizamento *in vitro* como o 2,4-diclorofenolacético (2,4-D), o picloram, o ácido beta-naftoxiacético (ANOA) e o ácido p-cloroenoxiacético (ApCFA) mas, de modo geral, estas estimulam a formação de calos e prejudicam o enraizamento (Grattapaglia & Machado, 1998).

Contudo, independente da fórmula estrutural da auxina, a excessiva concentração no meio de cultura pode ser tóxica e também favorecer a formação de calos na base das microestacas, comprometendo a rizogênese, como também o crescimento da parte aérea (Ono & Rodrigues, 1996; Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001).

A toxicidade promovida por elevadas concentrações de auxinas pode ser amenizada ou neutralizada pela utilização de duas fases durante o enraizamento *in vitro*, ou seja, no início do processo, as plântulas devem permanecer por algumas horas ou mesmo alguns dias na presença da auxina e posteriormente serem transferidas para o mesmo meio com baixa concentração de sais e isento do regulador (Grattapaglia & Machado, 1998).

A relação concentração de auxina e tempo de exposição do explante pode ser determinante para o desenvolvimento do enraizamento *in vitro* (Negash *et al.*, 2000; Bosa *et al.*, 2003). Tratamentos utilizando altas concentrações de auxina durante reduzido período e a transferência das plântulas para um meio livre de regulador de crescimento pode promover, de forma mais eficiente, o enraizamento (Horváth *et al.*, 2001). De acordo com McCown (1988), as dosagens efetivas situam-se, geralmente, entre 0,05 a 10,0 mgL⁻¹ para períodos mais prolongados, como dias ou até semanas e 50,0 a 100,0 mgL⁻¹ por períodos menores, como segundos ou horas.

Quando a base de microestacas de *Ilex aquifolium* foram imersas em 1 mgL⁻¹ de IBA durante uma semana e posteriormente inoculadas em meio WPM isento de IBA, aproximadamente 73% dos brotos enraizaram num período de quatro semanas (Majada *et al.*, 2000).

Kataoka & Inoue (1993) avaliaram o enraizamento *in vitro* de microestacas de *Eugenia javanica* imersas durante cinco segundos em diferentes concentrações de NAA e IBA. Eles observaram que a porcentagem de enraizamento aumentou de acordo com o aumento das concentrações de ambas auxinas utilizadas.

A importância da relação presença e concentração de auxina e tempo de permanência desse regulador vegetal, também foi demonstrada no trabalho realizado por Radmann *et al.* (2002). Eles avaliaram a capacidade de enraizamento *in vitro* de diferentes porta-enxertos de macieira e concluíram que a permanência das plântulas por 10 dias na presença de NAA, apresentaram maior porcentagem de enraizamento do que aquelas que permaneceram por períodos mais prolongados.

Kotsias & Roussos (2001), realizaram experimentos com *Citrus limon*, sendo que maior porcentagem de enraizamento (80%) e maior número de brotos foi obtido quando a base desses permaneceram por 5 segundos imersos em 1000 mgL⁻¹ de IBA.

Segundo Nodoye *et al.*, (2003) o tempo de permanência, o tipo e a concentração de auxinas também afetaram a indução de raízes adventícias *in vitro* em brotos de *Balanites aegyptiaca*. Estes autores relataram que ocorreu maior porcentagem de brotos enraizados, maior número e comprimento das raízes quando os explantes permaneceram em meio MS por 10 dias em 5 mgL⁻¹ de IBA. Resultados semelhantes foram obtidos com as espécies *Cornus florida*, *Artocarpus lakoocha*, *Withania somnifera* e *Acacia sinuata* (Manickam *et al.*, 2000; Vengadesan *et al.*, 2000; Joshee *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2005).

Outras espécies têm comportamento diferente quando expostas por tempo prolongado a ação das auxinas. *Limonium wrughtii*, *Rudgea viburnoides*, *Morus alba* e *Calliandra calothyrsus* são bastante exigentes quanto a necessidade de auxina para o enraizamento, necessitando, portanto, permanecerem em contato direto com o meio de cultura contendo regulador vegetal por tempo prolongado, ou seja, de um a dois meses para que haja o enraizamento de modo satisfatório (Tchigio & Duguma, 1998; Bhau & Wakhlu, 2001; Bonilla, 2002; Aloufa, 2003;).

A grande maioria dos trabalhos mencionados nesta revisão, tem o foco voltado ao estabelecimento do sistema radicular, mas a questão da funcionabilidade não pode ser relegada a segundo plano.

Alguns autores ressaltam que a formação de raízes grossas e/ou calos são indesejáveis durante esta etapa, visto que podem interferir na funcionabilidade do sistema radicular, comprometendo assim a aclimatização das plântulas e o completo desenvolvimento dos protocolos de micropropagação (Grattapaglia & Machado, 1998; Compton *et al.*, 2001).

A formação de calos na base das plântulas e a indução de raízes mais grossas tem sido mais frequentemente observada quando estas crescem em meios de cultura suplementado com a auxina NAA, embora o IAA e IBA também possa promovê-los (Grattapaglia & Machado, 1998; Compton *et al.*, 2001). Plantas como *Coleus forskohlii*, *Pistacia vera*, *Salvia sclarea* e *Limonium wrughtii* quando expostas a diferentes concentrações de NAA e IBA formam calos na base dos explantes e conseqüentemente inibem a indução de raízes (Reddy *et al.*, 2001; Onay, 2000; Liu *et al.*, 2000, Aloufa, 2003), entretanto, outras

espécies como por exemplo *Cyrtanthus clavatus* e *Cyrtanthus spiralis* mesmo quando submetidas a elevada dosagem desses reguladores, formam raízes sem a presença de calos (Morán *et al.*, 2003).

Além das auxinas, a adição de citocininas e/ou giberelinas ao meio de cultura, também interferem no enraizamento adventício (Mccown, 1988; Gaspar & Hofinger, 1988; Staden & Harty, 1988; Grattapaglia & Machado, 1998, Pasqual, 2001; Pinto & Lameira, 2001; Aloufa, 2003).

Pereira *et al.*, (2000) obtiveram melhor indução de raízes adventícias *in vitro* em plântulas de *Echinodorus scaber* quando estas foram cultivadas em meio MS suplementado somente com a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na concentração de 1,00 mgL⁻¹.

A associação de citocininas e auxinas também pode ser favorável ao enraizamento. Isso foi contestado com *Salvia sclarea*, *Ensete ventricosum* e *Acacia mangium*. Nessa última espécie o enraizamento *in vitro* foi obtido quando os brotos alongados permaneceram durante trinta dias em meio MS/2 contendo 2 mgL⁻¹ de NAA e 0,5 mgL⁻¹ de cinetina e posteriormente foram transferidos para meio MS/2 isento de regulador (Liu *et al.*, 2000; Negash *et al.*, 2000, Xie & Hong, 2001).

Apesar dos exemplos mencionados acima, as citocininas também podem ter um efeito inibitório sobre a indução de raízes adventícias *in vitro*; portanto, sua adição ao meio de enraizamento deve ser utilizada indistintamente. Muitas espécies com elevado nível de citocinina endógeno apresentam dificuldade quanto ao enraizamento e portanto, sua adição não é recomendada nesta fase (Mccown, 1988; Staden & Harty, 1988; Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998).

Trabalhos realizados com *Betula* mostraram que o enraizamento foi inibido proporcionalmente ao aumento da concentração das citocininas zeatina (ZEA) e isopenteniladenina (2iP) (Assis & Teixeira, 1998) e para muitas espécies de *Prunus*, o enraizamento não ocorreu quando altas concentrações de BAP e IBA foram adicionadas ao meio de enraizamento (Aloufa, 2003).

Além das citocininas, as giberelinas também podem ter uma ação inibitória sobre o enraizamento, por ter uma forte interação com outros hormônios, interferir na atividade de auxinas e inibir a divisão celular, associada com a fase de iniciação radicular

(Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998). Hansen (1988), relata alguns estudos que evidenciam o efeito negativo das giberelinas sobre o enraizamento de plântulas cultivadas *in vitro*, principalmente o GA₃ quando associado a auxinas.

2.5.7 Vitaminas, aminoácidos e outras substâncias

Vitaminas e aminoácidos também podem influenciar igualmente no enraizamento adventício *in vitro* (Chee, 1995; Bhattacharya, 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Aloufa, 2003). Chee (1995), relata que a tiamina tem um efeito positivo no desenvolvimento de raízes de *Taxus brevifolia* e *T. cuspidata* e cita alguns trabalhos indicando que esta é sintetizada nas folhas e transportada para as raízes e que a ocorrência da tiamina varia de acordo com as condições de crescimento da planta.

A formação de raízes adventícias é dependente de regulador vegetal e também de outras substâncias sinérgicas às auxinas, que em geral são sintetizadas nas folhas e se acumulam na zona de regeneração das raízes. O triacontanol é um exemplo desse tipo de substância que pode auxiliar no enraizamento. É um componente natural de cera epicuticular, que tem mostrado um aumento no crescimento vegetativo, teor de clorofila e peso seco de várias espécies de plantas, quando aplicado em condições de campo. O triacontanol está diretamente relacionado com a atividade de genes que regulam o processo de fotossíntese o que pode favorecer a indução de raízes adventícias pelo fornecimento de carboidratos e nutrientes (Horváth *et al.*, 2001).

Em estudos de micropropagação realizados com *Melissa officinales*, *Prunus davidiopersica* e espécies ornamentais lenhosas, o triacontanol tem sido apontado como agente indutor de raízes adventícias (Horváth *et al.*, 2001). Trabalho realizado por Horváth *et al.*, (2001) com *Malus domestica* e *Cerasus fruticosa* também confirma esse resultado. Esses autores mostraram que a adição de triacontanol aumentou efetivamente o número de raízes nas plântulas dessas espécies, e foi constatado um aumento no conteúdo de clorofila durante a fase de enraizamento.

2.5.8 Nutrição mineral

Outro aspecto importante a ser considerado na formação de raízes adventícias é a nutrição mineral. Teores adequados de macro e micronutriente especialmente nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, cálcio e boro, são importantes no processo de enraizamento (Blazich, 1988; Assis & Teixeira, 1998; Ansari *et al.*, 2004).

Nitrogênio, fósforo, zinco e manganês, são requeridos durante a iniciação das raízes. A importância do nitrogênio está relacionada com a síntese de proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos. Tem papel importante na produção de triptofano, precursor natural do IAA e de substâncias de reserva. O zinco e manganês influenciam o nível de auxinas endógenas. O cálcio é necessário para o crescimento e desenvolvimento das raízes, visto que a interrupção no suprimento deste, resulta imediatamente na não formação dos primórdios de raízes, e se já formadas, na redução do crescimento e conseqüente morte (Blazich, 1988).

O efeito do boro no enraizamento adventício também tem sido bastante estudado. Este nutriente é requerido tanto durante a fase de iniciação das raízes, quanto durante o crescimento porque é requerido para a manutenção da divisão celular. O boro parece estar relacionado com processos metabólicos, que influenciam diretamente no enraizamento, como os níveis de auxinas endógenas e a atividade da IAA/oxidase. Sua deficiência causa mudanças anatômicas, fisiológicas e bioquímicas que podem prejudicar a formação de raízes adventícias (Blazich, 1988; Ono, 1994; Ono & Rodrigues, 1996; Josten & Kutschera, 1999).

O efeito do boro sozinho ou em combinação com reguladores vegetais foi testado em *Heliantuhs annuus* com objetivo de promover a indução de raízes adventícias. Efeito significativo deste nutriente tanto para a iniciação de raízes quanto no desenvolvimento foi observado a partir de cortes anatômicos. A presença do boro permitiu a obtenção de um significativo número de explantes com raízes (Josten & Kutschera, 1999).

2.5.9 Carboidratos

Além dos nutrientes, os carboidratos também têm efeito sobre a formação de raízes adventícias (Veierskov, 1988; McCown, 1988; Ono & Rodrigues, 1996;

Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001; Aloufa, 2003). Durante a etapa de enraizamento, quantidades ótimas de carboidratos devem ser consideradas, visto que a sua influência sobre a formação das raízes *in vitro*, está relacionada ao requerimento de energia durante o processo de iniciação radicular (Assis & Teixeira, 1998).

Alguns autores ressaltam que a ação dos carboidratos sobre o enraizamento podem estar intimamente ligados às auxinas. A auxina pode influenciar diretamente no acúmulo basal de carboidratos, como também no aumento de sua concentração (Veierskov, 1988; McCown, 1988; Ono & Rodrigues, 1996; Assis & Teixeira, 1998; Aloufa, 2003).

No entanto, a relação exata entre auxinas, carboidratos e enraizamento é bastante complexa e o seu completo entendimento ainda é desconhecido e exige estudos mais elaborados neste aspecto (Veierskov, 1988; Aloufa, 2003).

Os carboidratos em si não aumentam a resposta ao enraizamento, e sim são fonte de energia e de carbono para a síntese de substâncias essenciais para a formação de raízes. No meio de cultura também exercem a função de agente osmótico (Aloufa, 2003).

Embora haja alguns trabalhos mostrando a superioridade da glicose por exemplo em relação a sacarose, a grande maioria dos trabalhos apontam esta última como a fonte de excelência em termos de carboidrato (Veierskov 1988; Ahée & Duhoux, 1994; Pierik *et al.*, 1997; Nicoloso *et al.*, 2003).

A concentração de carboidrato utilizada nos meios de cultura podem variar de acordo com as fases multiplicação, alongamento e enraizamento, mas em geral são mantidas entre 20 e 30 gL⁻¹ (McCown, 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001; Pinto & Lameira, 2001; Aloufa 2003; Souza, 2003).

Isutsa (2004) não obteve diferença quanto a porcentagem de enraizamento *in vitro* de *Passiflora edulis*, quando utilizou 20 ou 30 gL⁻¹ de sacarose, em ambas concentrações houve 100% de enraizamento. Nos estudos realizados por Leite *et al.*, (2000) com porta enxerto de pereira, maior porcentagem de enraizamento foi obtida com 20gL⁻¹ de sacarose; entretanto foi a concentração de 30 gL⁻¹ que promoveu maior comprimento de raízes.

2.5.10 Carvão ativado

Outras substâncias como o carvão ativado têm sido adicionadas ao meio de cultura para promover o enraizamento adventício. De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), seus efeitos benéficos podem ser físico, já que simula uma condição de escuro, situação mais favorável ao desenvolvimento de raízes adventícias, como também químico, adsorvendo substâncias prejudiciais ao enraizamento, como os compostos fenólicos.

O carvão ativado adsorve componentes do meio de cultura que podem prejudicar o enraizamento, como citocininas e/ou giberelinas residuais e componentes tóxicos inibidores ao enraizamento. Entretanto, pode também adsorver auxinas e nutrientes do meio, necessários ao enraizamento e desenvolvimento normal da parte aérea (McCown, 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001; Pinto & Lameira, 2001; Aloufa, 2003).

Todavia, é interessante ressaltar que este efeito fixador de auxinas pode ser benéfico. A adição de maiores concentrações desta no meio de enraizamento com carvão ativado, pode dispensar a necessidade da transferência do explante para outro meio isento de auxina, na fase de crescimento das raízes. No entanto, os explantes não devem permanecer muito tempo neste meio, porque a adsorção de nutrientes pode prejudicar o desenvolvimento normal das plântulas.

As concentrações de carvão adicionadas ao meio de enraizamento podem variar de 0,1 a 2% (Grattapaglia & Machado, 1998). Acima deste percentual o seu efeito fixador pode ser significativamente prejudicial (Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001; Pinto & Lameira, 2001; Aloufa, 2003).

De acordo com McCown (1988), o efeito do carvão no desenvolvimento da plântula *in vitro* depende da composição química do meio e do genótipo da planta.

Estudos de multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Acacia mearnsii* realizados em meio MS suplementado com carvão ativado, mostraram a eficiência desse elemento no enraizamento, no desenvolvimento normal da parte aérea e na prevenção de clorose nas folhas (Quoirin *et al.*, 2001). Efeito positivo no enraizamento de *Ensete ventricosum* e *Argania spinosa* foram também relatados por Negash *et al.*, (2000) e Bousselmame *et al.*, (2001), respectivamente.

Resultados negativos quanto ao enraizamento em meio contendo carvão ativo foram obtidos para a espécie *Ananas porteanus*, conhecida como abacaxi ornamental. Os resultados mostraram que ocorreu uma redução no tempo de indução, número de raízes e porcentagem de enraizamento (Borges *et al.*, 2001).

2.5.11 Poliaminas

Uma outra classe de substâncias que vêm sendo empregada para estimular o enraizamento adventício *in vitro* são as poliaminas. Consideradas uma nova classe de reguladores vegetais em plantas superiores, as poliaminas podem ter um efeito bastante benéfico neste contexto, por terem uma importante função no desenvolvimento de raízes primárias, laterais e adventícias (Couée *et al.*, 2004).

As poliaminas são compostos de baixo peso molecular, encontradas em organismos, podendo ocorrer na forma livre ou conjugada. As poliaminas de ocorrência mais comum são a espermidina, espermina, agmatina, ornitina, arginina e a diamina putrescina. A cadaverina é encontrada somente em algumas plantas (Sankhla & Upadhyaya, 1988; Couée *et al.*, 2004).

A ação das poliaminas no desenvolvimento de raízes pode estar relacionado à interação com hormônios vegetais, e interações bioquímicas inespecíficas a nível molecular, visto que a relação existente entre o metabolismo das poliaminas, síntese de etileno e metabolismo de aminoácidos também pode ter um impacto significativo no desenvolvimento de raízes. As poliaminas também são precursoras de alguns alcalóides que podem estar relacionados com o desenvolvimento de raízes, como foi visto em algumas espécies de asteraceae (Sankhla & Upadhyaya, 1988; Couée *et al.*, 2004).

O crescimento de raízes primárias e formação de raízes laterais envolve uma intensa atividade mitótica e são dependentes de fatores fisiológicos endógenos. Existe uma correlação entre o conteúdo endógeno de poliaminas e o desenvolvimento de raízes, relacionados à atividade de crescimento e diferenciação celular. A formação e o crescimento de raízes primárias, laterais ou adventícias está relacionado com a atividade dos meristemas apicais e o aumento na síntese de poliaminas (Sankhla & Upadhyaya, 1988; Couée *et al.*, 2004).

Durante o desenvolvimento das raízes, ocorre uma modificação significativa nos níveis de poliaminas, ocorrendo um decréscimo dessas substâncias com a inibição do crescimento das raízes, como também durante a senescência. O acúmulo, entretanto, está associado com o crescimento dos tecidos e com a organogênese (Sankhla & Upadhyaya, 1988; Couée *et al.*, 2004). Segundo Chen & Kao (1996), níveis de poliaminas e crescimento de plantas estão intimamente relacionados.

Poliaminas associadas ou não com as auxinas podem auxiliar na indução de raízes adventícias em plântulas de várias espécies cultivadas *in vitro*, mas altas doses podem ter efeito tóxico (Sankhla & Upadhyaya 1988; Neves *et al.*, 2002).

O ambiente tem influência direta no aumento ou decréscimo nos níveis de poliaminas. Determinados tipos de estresses ambientais podem influenciar na estrutura química e teor de poliaminas acumuladas nos tecidos radiculares o que promove maior ou menor desenvolvimento das raízes (Couée *et al.*, 2004).

2.5.12 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são substâncias que também podem influenciar positivamente na indução de raízes adventícias, quando atuam como co-fatores de enraizamento, ou negativamente, como no caso das quinonas, que são produtos da oxidação dos fenóis. A presença de quinonas em algumas espécies poder ser um indicativo da necessidade de suplementar o meio de cultura com substâncias anti-oxidantes, como os ácidos ascórbico e cítrico, e o polivinilpirrolidone (PVP), dentre outros (Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998).

A ação desses co-fatores está relacionada ao efeito indutor de auxinas, porque estimulam sua síntese e aumentam sua liberação. Eles também podem agir como protetores de auxinas endógenas, servindo de substrato alternativo para a IAA-oxidase.

Vários compostos fenólicos como o floroglucinol, o floridzin, o catecol e os ácidos clorogênico, caféico, florético e felúrico têm sido adicionados a meios de cultura com objetivo de promover o enraizamento (McCown, 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Lima, 1998; Assis & Teixeira, 1998; Aloufa, 2003). A rizocalina, hormônio indicado

para estimular a formação de raízes também é utilizado e atua como um co-fator ou seja um conjugado auxina-fenol (Lima, 1998).

Segundo Aloufa (2003) quando os polímeros de ortho-dihidroxifenóis agem como protetores de auxinas, têm a função de manter os tecidos em um estado reduzido, agindo como antioxidantes e mantendo um baixo potencial redox. Os ortho-dihidroxifenóis específicos (co-fatores de enraizamento), são produzidos nas folhas e brotos e translocados à região de enraizamento, onde, junto com auxinas e polifenoloxidasas, dão origem a um complexo estimulador de enraizamento que conduz à iniciação e crescimento do primórdio radicular. Para a formação do primórdio radicular, o complexo auxina-fenol é sintetizado através de polifenoloxidasas.

A elevação de níveis endógenos de floroglucinol em brotos favorece a iniciação de raízes durante a fase auxina-sensível, tendo uma ação sinérgica com a auxina. Nesse caso, a auxina pode agir como um protetor do floroglucinol que servirá de substrato alternativo para a IAA peroxidase e/ou oxidase e conseqüentemente os níveis de IAA endógeno permanecerão elevados (Aloufa, 2003). De modo geral, o floroglucinol aumenta o índice de enraizamento, provavelmente pela influência no metabolismo da auxina. Frequentemente é usado em combinação com auxinas no entanto os resultados obtidos com essa associação são diversos entre as espécies, inibindo ou favorecendo o enraizamento adventício (Lima, 1998). Segundo Grattapaglia & Machado (1998) as diferenças de resultados, quanto a ação de fenóis sobre a indução de raízes adventícias *in vitro* estão relacionadas aos fatores genéticos, condições fisiológicas da planta e ao tempo de exposição dos explantes à ação de fenóis e auxinas.

McCown (1988), relata que o efeito dos compostos fenólicos floroglucinol e floridzin, são sinérgicos com auxinas, porém a resposta é dependente do genótipo e de pré condições da cultura. O ácido clorogênico tem efeito sinérgico com o IAA em condições de luz.

Ibañez & Amo-Marco (1998) relataram vários estudos realizados *in vitro* mostrando que a adição de floroglucinol estimulou a iniciação de raízes em maçã ou cereja e também estimulam o desenvolvimento de brotos nessas espécies.

Quando Lima (1998) estudou a ação de fenóis sozinhos ou em combinação com auxinas na indução de raízes adventícias *in vitro* em plântulas de *Eucalyptus*

grandis observou que os resultados foram diferentes quanto ao tipo de fenol e/ou presença ou ausência de auxina. De um modo geral, o floroglucinol induziu o enraizamento na ausência de auxina. O floroglucinol e o ácido clorogênico favoreceram o número de raízes e o ácido caféico e a hidroquinona mostraram maiores médias para comprimento das raízes.

O efeito do floroglucinol como promotor de crescimento e desenvolvimento de brotos apicais foi testado em seis genótipos de batata, em combinação com duas concentrações de sacarose. O floroglucinol favoreceu a formação de brotações múltiplas, promoveu a proliferação dos brotos axilares e estimulou a formação de raízes (Sarkar & Naik, 2000).

Embora as substâncias fenólicas tenham importante papel no enraizamento de plântulas *in vitro* há algumas, principalmente as produzidas pelos explantes e liberadas para o meio de cultura na fase de multiplicação, que são consideradas inibidoras do enraizamento. Esses compostos fenólicos provocam um escurecimento na superfície de corte dos explantes e difundem-se para o meio de cultura e inibem o processo de rizogênese.

2.5.13 Condições ambientais

Fatores ambientais relacionados a condições de crescimento das culturas *in vitro* também influenciam igualmente no enraizamento. A intensidade luminosa e a presença ou ausência de luz interferem no enraizamento, uma vez que têm efeito direto ou indireto sobre a produção de açúcar, auxinas, fenóis e enzimas endógenas, particularmente peroxidase. Para algumas espécies a redução da luz pode favorecer a estiolação do caule o que estimula a indução de raízes adventícias (Mccown, 1988; Aloufa, 2003).

Nos estudos de propagação *in vitro* realizados por Anand & Rao (2000) com *Piper barberi*, plantas cultivadas no escuro tiveram maior porcentagem de enraizamento e maior número de raízes do que aquelas cultivadas na presença de luz. Resultados semelhantes foram obtidos com *Quercus robur* (Pierik *et al.*, 1997).

Para outras espécies como pereira, o aumento da intensidade luminosa favoreceu o desenvolvimento do sistema radicular (Leite *et al.*, 2000).

Condições de luz e escuro também foram estudadas no enraizamento *in vitro* de diferentes espécies de *citrus* sp. Houve variações evidentes entre os genótipos,

presença ou ausência da auxina e condições de iluminação. Para *Citrus aurantium* os resultados não diferiram significativamente entre luz, escuro e presença ou ausência de NAA. Para a espécie *Citrus macrophylla* e *C. sinensis*, a necessidade de luz para o enraizamento foi evidente; mais de 60% das plântulas enraizaram na presença de luz (Leite *et al.*, 2000).

De acordo com Leite *et al.*, (2000) o aumento da intensidade luminosa durante os últimos estágios da fase de enraizamento pode facilitar a aclimatização e aumentar a sobrevivência das plântulas, uma vez que estimula a fotossíntese, o aumento da cera epicuticular e a melhoria da relação hídrica.

Outro fator físico a ser considerado no enraizamento de plântulas cultivadas *in vitro* é a temperatura. De modo geral a temperatura ambiente da sala de crescimento, pode variar entre a faixa de 20 e 30°C (Grattapaglia & Machado, 1998, Aloufa, 2003) e de modo geral não interferem no enraizamento. Trabalhos realizados por Corrêa & Fett-Neto (2004) com *Eucalyptus saligna* e *E. globulus* mostraram que a temperatura não influenciou na porcentagem de enraizamento, mas o número e o comprimento das raízes variaram de acordo com as diferentes temperaturas testadas.

De acordo com os trabalhos mencionados nesta revisão, nota-se que muitos fatores estão relacionados à formação de raízes adventícias *in vitro*, como o genótipo, a juvenilidade, os níveis endógenos de auxina, compostos nitrogenados, compostos fenólicos e carboidratos, a condição nutricional da planta, a composição e condição do meio de cultura, a necessidade da suplementação do meio com auxina exógena, o tempo de permanência da plântula neste regulador, a presença de outros reguladores vegetais como citocininas e/ou giberelinas, dentre outros.

Muitos trabalhos cujo foco é o enraizamento *in vitro* têm sido realizados com grande êxito. Entretanto, para um número significativo de espécies, as condições ótimas de enraizamento ainda não foram encontradas, apesar de numerosos experimentos realizados, levando em consideração todos os fatores acima mencionados.

A completa elucidação dos mecanismos envolvidos no enraizamento *in vitro* ainda não foi obtida, portanto os trabalhos realizados com a cultura de tecidos, com enfoque bioquímico, objetivando o enraizamento são contribuições valiosas que no futuro poderão viabilizar o completo estabelecimento de protocolos de micropropagação de plantas com potencial econômico, ecológico e terapêutico.

2.6 Micorrizas

A capacidade das plantas de estabelecer relações compatíveis com certos grupos de fungos do solo é um fenômeno generalizado na natureza. Dentre estas inúmeras relações biológicas, destacam-se as simbioses entre plantas e organismos heterotróficos, como as micorrizas, que são associações entre fungo de solo e raízes (palavra derivada do grego: mico = fungo e riza = raízes) (Miranda & Miranda, 2001; Moreira & Siqueira, 2002; Siqueira *et al.*, 2002; Miranda & Miranda, 2003, Aidar *et al.*, 2004).

Estudos em raízes fossilizadas evidenciam que as micorrizas surgiram há cerca de 400 milhões de anos, período em que coincide com o aparecimento das plantas terrestres e fortes evidências indicam que estas desempenharam um papel crucial na conquista do ambiente terrestre pelas plantas (Moreira & Siqueira, 2002; Siqueira *et al.*, 2002).

A evolução das MAs parece ter acontecido nos trópicos, mas sua ocorrência é generalizada na grande maioria das espécies vegetais cultivadas e não cultivadas do planeta, portanto, considerada como uma simbiose universal. Alguns autores afirmam que a ocorrência das MAs nas plantas superiores pode ser considerada “regra na natureza” e não exceção (Júnior & Siqueira, 1996; Souza *et al.*, 2002; Moreira & Siqueira, 2002; Aidar *et al.*, 2004).

De modo geral, as micorrizas são classificadas de maneira simplificada em ecto e endomicorrizas. Na ectomicorriza, o fungo tem desenvolvimento intercelular no córtex da raiz da planta formando a “rede de Hartig” e apresenta um manto hifal espesso aderido externamente às raízes, que pode ser visto a olho nu. Na endomicorriza, o fungo se desenvolve inter e intracelularmente no córtex da raiz, formando estruturas fúngicas específicas dentro das células corticais. Não há formação do manto hifal externo e não ocorrem alterações morfológicas visíveis na raiz (Miranda & Miranda, 1997).

As endomicorrizas ou micorrizas arbusculares (MAs) são formadas por fungos da Ordem Glomales (Zigomicetos) e são as mais comuns nos ecossistemas terrestres. Geralmente apresentam uma distribuição geográfica mais ampla do que a ectomicorriza (Miranda & Miranda, 1997; Moreira & Siqueira, 2002; Siqueira *et al.*, 2002; Strack *et al.* 2003; Aidar *et al.*, 2004).

Todavia, mesmo que a ocorrência desses fungos, seja ampla, onde mais de 80% das plantas podem formar MA (Araújo, *et al*, 2004), até os dias atuais, somente 3% das espécies vegetais foram examinadas quanto à sua presença (Siqueira *et al.*, 2002).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são freqüentemente encontrados em associação com espécies nativas em ecossistemas naturais. Sua ocorrência nestes locais favorece o estabelecimento, a sobrevivência e o crescimento de plantas hospedeiras e não hospedeiras devido ao aumento na absorção de água e nutrientes, especialmente fósforo, nitrogênio, zinco e cobre (Aidar *et al.*, 2004; Pouyú-Rojas & Siqueira, 2000). As MAs também estão envolvidas na conservação, armazenagem e ciclagem de nutrientes em ecossistemas florestais (Pereira *et al.*, 1996).

A maior absorção de fósforo estimula o crescimento das plantas, melhora sua qualidade e aumenta a resistência aos estresses ambientais. A maior tolerância à seca das plantas micorrizadas, pode ser devido a uma melhor nutrição em fósforo ou a uma maior absorção de água proporcionada pela hifa micorrízica (Souza *et al.*, 2002).

Segundo Santos *et al.*, (2002), os estímulos ao crescimento das plantas atribuídos aos FMAs estão fortemente correlacionados com o maior acúmulo de nutrientes de baixa mobilidade, como o fósforo.

Os FMAs colonizam as raízes de plantas de quase todos os gêneros de Gimnospermas e Angiospermas, além de alguns representantes das Briófitas e Pteridófitas, podendo ser encontrados em plantas herbáceas, arbustivas ou arbóreas que ocupam os mais diversos ecossistemas. Associam-se à maioria das plantas nativas dos trópicos e à espécies de interesse econômico. São simbiotróficos obrigatórios, pois completam seu ciclo de vida apenas se estiverem associados a uma planta hospedeira, no entanto, não há evidências de especificidade hospedeira e não ocorrem alterações morfológicas macroscópicas nas raízes colonizadas. A presença das associações é detectada somente através de observações microscópicas de raízes clarificadas e coloridas com corantes especiais (Siqueira *et al.*, 2002; Moreira & Siqueira, 2002).

As micorrizas arbusculares são formadas por três componentes: a raiz da planta hospedeira, as estruturas formadas no córtex radicular (arbúsculos, vesículas e o micélio) e esporos extra-radiculares. As vesículas são estruturas globosas ou alongadas contendo grânulos de glicogênio e lipídios, são consideradas estruturas de estocagem de

fungos e podem ser formadas dentro ou fora das células do córtex. Os arbúsculos são as estruturas características das MAs. São formados pela intensa ramificação de hifas intracelulares e são responsáveis pela troca de nutrientes entre os simbiossiontes. As hifas intra e extra-radulares são importantes como propágulos para iniciar nova colonização, para gerar novos esporos, para aquisição de nutrientes e ainda podem favorecer a agregação do solo (Siqueira *et al.*, 2002; Moreira & Siqueira, 2002).

O processo de colonização das raízes pelos FMAs é caracterizado pelo crescimento intracelular das hifas no tecido cortical e pela diferenciação de hifas em estruturas semelhantes a haustórios, chamadas arbúsculos, que são estruturas típicas intra-radulares altamente ramificadas. Em alguns grupos taxonômicos, também são formadas as vesículas (Lambais, 1996; Siqueira *et al.*, 2002; Moreira & Siqueira, 2002; Strack *et al.* 2003).

Os esporos formados pelos FMAs são assexuados e servem para sua disseminação e sobrevivência. Possuem diâmetro que varia de 45 a 700 µm, coloração hialina, amarronzada ou mesmo preta, e forma globosa, alongada e muitas vezes irregular, podendo ter parede lisa ou ornamentada. Os tipos de esporos são distinguíveis em função de sua ontogenia, que, juntamente com características estruturais, formam a base da taxonomia e sistemática dos FMAs. A diversidade estrutural nos esporos permite reconhecer atualmente cerca de 168 fungos Glomaleanos, pertencentes a sete gêneros distribuídos em cinco famílias (Siqueira *et al.*, 2002; Moreira & Siqueira, 2002).

A ocorrência e densidade dos FMAs nos solos, dependem geralmente das características da planta hospedeira, do fungo micorrízico e dos fatores ambientais como solo e clima. A população natural é também diversificada, podendo ser encontrada em torno de cinco a seis espécies/isolados convivendo na mesma rizosfera (Miranda & Miranda, 1997).

Alguns estudos realizados sobre a ocorrência dos FMAs em ecossistemas naturais e em agrossistemas no Brasil, indicam que o número de espécies pode variar de 35 em dunas costeiras até mais de 40 em cultivos de café e no cerrado nativo. Neste último, as espécies predominantes geralmente são *Scutellospora pellucida*, *Gigaspora margarita* e *Paraglomus diaphanun* (Siqueira *et al.*, 2002).

Os diversos levantamentos realizados em diferentes tipos de solos do cerrado, mostraram que os FMAs ocorrem em grande número de plantas nativas da região. Alguns estudos permitiram a detecção de 56 e/ou 62 espécies vegetais colonizadas por esses

fungos. Outros estudos mostraram que nos solos da região dos cerrados, foram encontrados esporos de cerca de 30 espécies/isolados (Miranda & Miranda, 1997).

Nos estudos sobre a ocorrência de FMAs em solos de cerrado realizados por Alvarenga *et al.* (1999), os resultados mostraram uma tendência a ocorrência de um maior número de esporos na cultura anual e menor no cerrado nativo. Maior porcentagem de ocorrência no cerrado nativo ($\geq 20\%$), variou entre as espécies *Glomus* sp, *Scutellospora* sp, *Acaulospora longula* e *Gigaspora* sp..

De acordo com Miranda & Miranda (2001), o manejo adequado da associação planta/fungo no campo, pode constituir uma alternativa viável para aumentar a eficiência nas práticas de cultivo das diversas espécies de interesse, sendo especialmente importante em solos ácidos e de baixa fertilidade, como os do cerrado.

Alguns estudos mostraram que em outros ecossistemas, com solos ácidos e de baixa fertilidade, encontrados na Amazônia, detectou-se a ocorrência de FMAs nativos em algumas espécies medicinais e condimentares, como malva, guaraná e pimenta-do-reino (Miranda & Miranda, 1997).

Zangaro *et al.* (2002), relatam a incidência da colonização de MAs em 81 espécies arbóreas nativas da bacia do rio Tibagi (PR) e em 51 espécies arbóreas nativas de áreas em início de sucessão arbórea e no interior da floresta estacional semidecidual do Parque Estadual Mata dos Godoy em Londrina (PR).

De acordo com os estudos realizados por Carneiro *et al.* (1998), pôde-se observar significativa diferença da incidência das MAs nas espécies arbóreas e arbustivas nativas estudadas sob diferentes condições. Para a família Bignoniaceae, os resultados variaram entre baixa e alta incidência de MAs em condições de casa de vegetação, viveiro e cerrado. Resultados semelhantes também foram observados para outros gêneros, como *Palicourea*, *Caryocar*, *Bauhinia*, dentre outros.

Muitos autores destacam as ações benéficas das micorrizas arbusculares (Lovato *et al.*, 1996; Lambais, 1996; Berbara & Fonseca, 1996; Miranda & Miranda, 1997; Siqueira, 1988; Graziotti, 1999; Filho & Siqueira, 1999; Pouyú-Rojas & Siqueira, 2000; Miranda & Miranda, 2001; Souza *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002; Siqueira *et al.*, 2002; Moreira & Siqueira, 2002; Santos *et al.*, 2002; Strack *et al.* 2003; Miranda & Miranda, 2003; Aida *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2004).

Dentre elas destacam-se, ação biofertilizadora, visto que promove a maior absorção e utilização de nutrientes do solo, o favorecimento da nodulação e fixação de N_2 em leguminosas, a amenização de estresses nutricionais e nutrição balanceada e o maior acesso a nutrientes poucos disponíveis; ação biocontroladora, por agir no biocontrole de certos patógenos e pragas, reduzir os danos causados por pragas e doenças, amenizar os estresses causados por fatores diversos como metais pesados e poluentes orgânicos e promover efeitos benéficos na agregação do solo, melhorar e conservar a água e o solo; e ação biorreguladora, por atuar na produção/acúmulo de substâncias reguladoras do crescimento, interferir favoravelmente na relação água-planta, como o aumento da tolerância a déficit hídrico, e promover alterações bioquímicas e fisiológicas, como acúmulo de certos metabólitos secundários.

Como as MAs são formadas pela planta, por fungo e com grande influência do solo, modulados pelo ambiente e manejo do ecossistema, alguns fatores relacionados a estes componentes podem influenciar de modo direto ou indireto a sua formação, ocorrência e o seu funcionamento (Siqueira, 1988; Grazziotti, 1999; Miranda & Miranda, 2001; Moreira & Siqueira, 2002; Aidar *et al.*, 2004).

Em relação ao solo, destacam-se a disponibilidade de nutrientes, o pH, a ocorrência de elementos tóxicos, a salinidade, as características físicas como textura, estrutura, agregação, densidade e umidade e a presença de organismos. Em relação a planta, destacam-se a espécie, variedade, a presença de cobertura vegetal, nutrição, idade, ciclo e taxa de crescimento, alelopatia, sistema radicular, exsudação e senescência. Em relação ao ambiente, destacam-se a intensidade luminosa, a temperatura, a sazonalidade, a precipitação, a poluição atmosférica e a poluição do solo. Em relação ao manejo, destacam-se o histórico da área, o tipo de cultivo, a erosão, a irrigação, fertilizantes e corretivos, o controle de ervas infestantes, o pastejo e o uso de biocidas (Siqueira, 1988; Grazziotti, 1999; Miranda & Miranda, 2001; Moreira & Siqueira, 2002).

De modo geral, as plantas se diferem quanto à capacidade de formarem micorrizas em relação a dependência. São agrupadas em espécies micorrízicas obrigatórias, micorrízicas facultativas e não micorrízicas. As primeiras, são aquelas que têm o crescimento extremamente reduzido na ausência de micorrizas. Inclui as plantas com sistema radicular dominado por raízes curtas, grossas, pouco desenvolvidas e com pouco pêlo absorvente. As

segundas, apresentam um sistema radicular mais desenvolvido e mais eficiente na absorção de água e nutrientes do solo. As taxas de colonização micorrízica são geralmente mais baixas e as plantas são menos responsivas à inoculação e só se beneficiam da associação em condições muito estressantes ao crescimento. As plantas não micorrízicas incluem aquelas que não formam micorrizas. Não dependem e não se beneficiam da associação com os fungos (Siqueira, 1988; Grazziotti, 1999; Miranda & Miranda, 2001; Moreira & Siqueira, 2002).

Nos estudos realizados por Carneiro *et al.* (1996) os resultados mostraram significativa diferença em relação a dependência micorrízica entre as 31 espécies estudadas. Nas espécies *Stenolobium stans* e *Jacaranda mimosaeifolia*, pertencentes à família Bignoniaceae, a taxa de colonização micorrízica foi maior de 60%. Outras espécies como *Copaifera langsdorf*, *Bauhinia* sp., dentre outras, não apresentaram dependência micorrízica.

Em algumas espécies, como o eucalipto, o estabelecimento da associação MA é conhecida há mais de 20 anos, e os benefícios têm sido explorados comercialmente (Araújo *et al.*, 2004).

Siqueira *et al.*, (2002), demonstraram em seus estudos que os FMAs também atuam na produção/acúmulo de substâncias reguladoras de crescimento, promovendo alterações bioquímicas e fisiológicas, como o acúmulo de metabólitos secundários.

Silva-Júnior & Siqueira (1997), ressaltam que pelo fato do processo de colonização das raízes por FMAs envolver uma série de eventos morfo-fisiológicos e bioquímicos, regulados pelo genoma do fungo e da planta e por fatores ambientais, existe uma interação significativa entre a presença de raízes e dos exsudatos radiculares, estimulando o crescimento simbiótico destes fungos, através da existência de fatores químicos ativos, e maior produção/acúmulo de metabólitos secundários pelas plantas.

Alguns estudos têm sido realizados neste contexto. Compostos fenólicos, como os flavonóides, flavonas e isoflavonóides como a formononetina, podem estimular o crescimento de FMAs e a colonização micorrízica, que podem favorecer posteriormente uma maior produção/acúmulo de determinados metabólitos secundários (Siqueira *et al.*, 2002; Silva-Júnior & Siqueira (1997).

Strack *et al.* (2003) também ressaltam que existe uma relação entre MAs e maior acúmulo dessas substâncias, podendo haver um aumento no acúmulo de jasmonato, ácido abscísico, citocininas e carotenóides.

Nos estudos realizados Akiyama & Hayashi (2002), foi observado que houve um aumento significativo no acúmulo de três terpenos em raízes de *Cucumis sativus* inoculadas com o FMA *Glomus caledonium*. Dois novos triterpenos foram identificados (2 β -hidroxibrionólico e 3 β -briofelúrico) e o triterpeno conhecido, ácido brionólico. A posterior colonização das raízes também promoveu um maior acúmulo dos terpenoides e a inoculação com o fungo *Glomus mosseae*, também aumentou o acúmulo dos triterpenos.

Moraes *et al.* (2004) relataram um aumento de podofilotoxina e lignanas em plantas de *Podophyllum peltatum* inoculadas *ex vitro* com a espécie micorrízica *G. ramisporophora*.

Neste contexto, verifica-se a relevância de estudos que objetivam ampliar as pesquisas entre a relação de micorrizas em espécies vegetais com propriedades medicinais e a produção de metabólitos secundários de interesse terapêutico, com futuras aplicações práticas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. ex de Souza, *Mandevilla illustris* (Vell.) R. E. Woodson e *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson

3.1.1 Condições gerais do experimento

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

Exsicatas das espécies *M. velutina*, *M. illustris* e *A. arvense* estão depositadas no Herbário de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (HPM - UNAERP), sob os registros nº 013, 012 e 561, respectivamente.

Como fonte de explantes para as espécies *M. velutina* e *M. illustris* foram utilizadas brotações já estabelecidas *in vitro* em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) semi-sólido suplementado com 0,5 mgL⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina). Para a espécie *A. arvense* foram utilizadas sementes previamente germinadas *in vitro* em meio MS/2 semi-sólido. Os explantes foram mantidos em cubetas de vidro (25 x 85 mm), tampadas com tampa plástica e vedadas com parafilme. As cubetas foram colocadas em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura 26 ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 25 µmol.m⁻².s⁻¹, fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria.

Para o desenvolvimento do sistema subterrâneo das espécies em estudo, realizou-se os seguintes experimentos:

1) Efeito do tempo de permanência dos explantes em presença de NAA e IBA

Este experimento foi realizado com as três espécies em estudo.

Foram realizados dois experimentos utilizando as auxinas NAA (ácido naftaleno acético) e IBA (ácido indol butírico). Para as espécies *M. illustris* e *M. velutina*, brotações com 4-5 cm de comprimento foram inoculadas em meio de cultura MS/2 líquido, suplementado com 0, 1, 2, 4 e 6 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, onde permaneceram por períodos de 5, 10, 15 e 30 dias. Para a espécie *A. arvense*, brotações com 3-4 cm de comprimento foram inoculadas em meio de cultura MS/2 líquido, suplementados com 0,1, 2 e 4 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, onde permaneceram por períodos de 10, 15 e 30 dias. Posteriormente as brotações foram transferidas para o mesmo meio, porém sem a adição do regulador. As brotações que permaneceram por 30 dias não foram transferidas e o tratamento 0 mgL⁻¹ foi tomado como controle em todos os experimentos.

Os tratamentos foram: 0 – controle - MS/2; 1 - MS/2 + 1 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência de 5 dias; 2- MS/2 + 1 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência de 10 dias; 3 - MS/2 + 1 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência de 15 dias; 4 - MS/2 + 1 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência de 30 dias; 5 - MS/2 + 2 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência de 5 dias; 6 - MS/2 + 2 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência de 10 dias; 7 - MS/2 + 2 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência de 15 dias; 8 - MS/2 + 2 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência de 30 dias; 9 - MS/2 + 4 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência de 5 dias; 10 - MS/2 + 4 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência de 10 dias; 11 - MS/2 + 4 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência de 15 dias; 12 - MS/2 + 4 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência de 30 dias; 13 - MS/2 + 6 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência de 5 dias; 14 - MS/2 + 6 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência de 10 dias; 15 - MS/2 + 6 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência de 15 dias; 16 - MS/2 + 6 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, tempo de permanência de 30 dias.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4x4, para as espécies *M. illustris* e *M. velutina*, totalizando 16 tratamentos, mais o controle, e em esquema fatorial 3x3, para a espécie *A. arvense*, totalizando 9 tratamentos, mais o controle.

2) Efeito de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas

Este experimento foi realizado com as três espécies em estudo.

Para as espécies *M. illustris* e *M. velutina*, foram realizados dois experimentos utilizando os meios MS e MS/2 líquido e brotações com 4-5 cm de comprimento. Para a espécie *A. arvense*, realizou-se somente um experimento utilizando-se o meio MS/2 líquido e brotações com 4,5-5,5 cm de comprimento.

Os meios foram suplementados com 0, 1, 5 e 10 mgL⁻¹ das poliaminas: espermina e espermidina e das diaminas: putrescina e 1,3 diaminopropano, em diferentes tratamentos, sendo: 0 - controle - MS ou MS/2; 1 - MS ou MS/2 + 1 mgL⁻¹ de espermina; 2 - MS ou MS/2 + 5 mgL⁻¹ de espermina; 3 - MS ou MS/2 + 10 mgL⁻¹ de espermina; 4 - MS ou MS/2 + 1 mgL⁻¹ de espermidina; 5 - MS ou MS/2 + 5 mgL⁻¹ de espermidina; 6 - MS ou MS/2 + 10 mgL⁻¹ de espermidina; 7 - MS ou MS/2 + 1 mgL⁻¹ de putrescina; 8 - MS ou MS/2 + 5 mgL⁻¹ de putrescina; 9 - MS ou MS/2 + 10 mgL⁻¹ de putrescina; 10 - MS ou MS/2 + 1 mgL⁻¹ de 1,3-diaminopropano; 11 - MS ou MS/2 + 5 mgL⁻¹ de 1,3-diaminopropano; 12 - MS ou MS/2 + 10 mgL⁻¹ de 1,3-diaminopropano.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3x4, totalizando 12 tratamentos, mais o controle.

3) Efeito de auxina e poliaminas

Este experimento foi realizado com as espécies *M. illustris* e *M. velutina*.

Após a determinação da melhor concentração e tipo de auxina bem como da melhor poliamina nos experimentos realizados anteriormente, realizou-se este experimento associando ambos os compostos.

Para a espécie *M. illustris*, o meio MS/2 líquido foi suplementado com 1 mgL⁻¹ de NAA + 1, 5 e 10 mgL⁻¹ da poliamina espermidina. Para a espécie *M. velutina*, o meio MS/2 líquido foi suplementado com 1 mgL⁻¹ de NAA + 1, 5 e 10 mgL⁻¹ da diamina putrescina. O tratamento meio MS/2 líquido + 1 mgL⁻¹ de NAA foi tomado como controle, nos dois experimentos. Para as duas espécies foram utilizadas brotações com 4-5 cm de comprimento.

Os experimentos foram conduzidos em DIC, totalizando 4 tratamentos, sendo: 0 - controle - MS/2 + 1 mgL⁻¹ de NAA; 1 - MS/2 + 1 mgL⁻¹ de NAA + 1 mgL⁻¹ de espermidina ou putrescina; 2 - MS/2 + 1 mgL⁻¹ de NAA + 5 mgL⁻¹ de espermidina ou putrescina; 3 - MS/2 + 1 mgL⁻¹ de NAA + 10 mgL⁻¹ de espermidina ou putrescina.

4) Efeito do Dithiothreitol

Este experimento foi realizado com as três espécies em estudo.

Brotações das espécies em estudo foram deixadas durante 1 hora em solução de 8 mgL⁻¹ de ágar contendo 0,20 mgL⁻¹ de NAA e depois foram transferidas para o meio MS + 2 gL⁻¹ de fitagel®, suplementado com dithiothreitol (DTT) nas concentrações de 0; 0,10 e 0,25 mg.L⁻¹, em diferentes tratamentos. O tratamento 0 mgL⁻¹ de DTT foi tomado como controle em todos os experimentos. Para as espécies *M. velutina* e *A. arvense*, utilizou-se brotações com 3-4 cm de comprimento e para a espécie *M. illustris*, utilizou-se brotações com 2-3 cm de comprimento.

Os experimentos foram conduzidos em DIC, totalizando três tratamentos, sendo: 0 - controle - MS; 1 - MS + 0,10 mgL⁻¹ de DTT; 2 - MS + 0,25 mgL⁻¹ de DTT.

5) Efeito do nitrato de prata (AgNO_3) e tempo de permanência no meio de cultura

Este e os demais experimentos a seguir, foram realizados somente com a espécie *M. velutina*.

Brotações com 4-5 cm de comprimento foram inoculadas em meio de cultura MS/2 + 2 g L^{-1} de fitagel[®] suplementados com 10, 20, 50 e 100 mg L^{-1} de AgNO_3 . As brotações permaneceram em tais condições por períodos de 10, 15 e 30 dias e posteriormente foram transferidas para o mesmo meio, porém sem a adição de AgNO_3 . As brotações que permaneceram por 30 dias não foram transferidas e este tratamento foi tomado como controle.

O experimento foi conduzido em DIC, em esquema fatorial 4x3, totalizando 12 tratamentos, sendo: 1 - MS/2 + 10 mg L^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência de 10 dias; 2 - MS/2 + 10 mg L^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência de 15 dias; 3 - MS/2 + 10 mg L^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência de 30 dias; 4 - MS/2 + 20 mg L^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência de 10 dias; 5 - MS/2 + 20 mg L^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência de 15 dias; 6 - MS/2 + 20 mg L^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência de 30 dias; 7 - MS/2 + 50 mg L^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência de 10 dias; 8 - MS/2 + 50 mg L^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência de 15 dias; 9 - MS/2 + 50 mg L^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência de 30 dias; 10 - MS/2 + 100 mg L^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência de 10 dias; 11- MS/2 + 100 mg L^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência de 15 dias; 12 - MS/2 + 100 mg L^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência de 30 dias.

6) Efeito do ácido bórico e NAA

Brotações com 5-6 cm de comprimento foram inoculadas em meio de cultura MS/2 líquido suplementado com 0, 1, 10, 50 e 100 mg L^{-1} de ácido bórico associado com 0, 1, e 2 mg L^{-1} de NAA. O tratamento 0 mg L^{-1} foi tomado como controle.

O experimento foi conduzido em DIC, em esquema fatorial 3x5, totalizando 15 tratamentos, sendo: 0 - controle - MS/2 + 0 mg L^{-1} de ác. bórico + 0 mg L^{-1} de NAA; 1 - MS/2 + 0 mg L^{-1} de ác. bórico + 1 mg L^{-1} de NAA; 2 - MS/2 + 0 mg L^{-1} de ác. bórico + 2 mg L^{-1} de NAA; 3 - MS/2 + 1 mg L^{-1} de ác. bórico + 0 mg L^{-1} de NAA; 4 - MS/2 + 1 mg L^{-1} de ác. bórico + 1 mg L^{-1} de NAA; 5 - MS/2 + 1 mg L^{-1} de ác. bórico + 2 mg L^{-1} de NAA; 6 -

MS/2 + 10 mgL⁻¹ de ác. bórico + 0 mgL⁻¹ de NAA; 7 - MS/2 + 10 mgL⁻¹ de ác. bórico + 1 mgL⁻¹ de NAA; 8 - MS/2 + 10 mgL⁻¹ de ác. bórico + 2 mgL⁻¹ de NAA; 9 - MS/2 + 50 mgL⁻¹ de ác. bórico + 0 mgL⁻¹ de NAA; 10 - MS/2 + 50 mgL⁻¹ de ác. bórico + 1 mgL⁻¹ de NAA; 11 - MS/2 + 50 mgL⁻¹ de ác. bórico + 2 mgL⁻¹ de NAA; 12 - MS/2 + 100 mgL⁻¹ de ác. bórico + 0 mgL⁻¹ de NAA; 13 - MS/2 + 100 mgL⁻¹ de ác. bórico + 1 mgL⁻¹ de NAA; 14 - MS/2 + 100 mgL⁻¹ de ác. bórico + 2 mgL⁻¹ de NAA.

7) Efeito do floroglucinol e NAA

Brotações com 5-6 cm de comprimento foram inoculadas em meio de cultura MS/2 líquido suplementado com 0, 50, 100 e 200 mgL⁻¹ de floroglucinol associado com 0, 1 e 2 mgL⁻¹ de NAA. O tratamento 0 mgL⁻¹ foi tomado como controle.

O experimento foi conduzido em DIC, em esquema fatorial 4x3, totalizando 12 tratamentos, sendo: 0 – controle - MS/2 + 0 mgL⁻¹ de floroglucinol + 0 mgL⁻¹ de NAA; 1 - MS/2 + 0 mgL⁻¹ de floroglucinol + 1 mgL⁻¹ de NAA; 2 - MS/2 + 0 mgL⁻¹ de floroglucinol + 2 mgL⁻¹ de NAA; 3 - MS/2 + 50 mgL⁻¹ de floroglucinol + 0 mgL⁻¹ de NAA; 4 - MS/2 + 50 mgL⁻¹ de floroglucinol + 1 mgL⁻¹ de NAA; 5 - MS/2 + 50 mgL⁻¹ de floroglucinol + 2 mgL⁻¹ de NAA; 6 - MS/2 + 100 mgL⁻¹ de floroglucinol + 0 mgL⁻¹ de NAA; 7 - MS/2 + 100 mgL⁻¹ de floroglucinol + 1 mgL⁻¹ de NAA; 8 - MS/2 + 100 mgL⁻¹ de floroglucinol + 2 mgL⁻¹ de NAA; 9 - MS/2 + 200 mgL⁻¹ de floroglucinol + 0 mgL⁻¹ de NAA; 10 - MS/2 + 200 mgL⁻¹ de floroglucinol + 1 mgL⁻¹ de NAA; 11 - MS/2 + 200 mgL⁻¹ de floroglucinol + 2 mgL⁻¹ de NAA.

8) Efeito da concentração de NAA e IBA e presença de carvão ativado em meio líquido e semi-sólido

Brotações com 4-5 cm de comprimento, foram inoculadas em meio de cultura MS/2 + 100 mgL⁻¹ de carvão ativado, suplementado com 0, 1, 2 e 4 mgL⁻¹ de NAA ou IBA. O tratamento 0 mgL⁻¹ foi tomado como controle. No experimento com meio semi-sólido, utilizou-se + 2 gL⁻¹ de fitagel[®].

O experimento foi conduzido em DIC, totalizando 4 tratamentos, sendo: 0 - controle - MS/2 + 100 gL⁻¹ de carvão ativado; 1 - MS/2 + 100 gL⁻¹ de carvão ativado + 1 mgL⁻¹ de NAA ou IBA; 2 - MS/2 + 100 gL⁻¹ de carvão ativado + 2 mgL⁻¹ de NAA ou IBA; 3 - MS/2 + 100 gL⁻¹ de carvão ativado + 4 mgL⁻¹ de NAA ou IBA.

Para a instalação de todos os experimentos, utilizou-se brotações previamente repicadas com 30 dias, aproximadamente, padronizando o comprimento da parte aérea. Para todos os tratamentos, em todos os experimentos, utilizou-se 10 mL de meio e o pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem. Cada tratamento constituiu-se de 6 repetições e 5 cubetas/repetição. Para os tratamentos em meio líquido, utilizou-se papéis de filtro como suporte sólido.

Os experimentos foram instalados utilizando-se cubetas de vidro (25 x 85 mm), tampadas com tampa plástica e vedadas com parafilme. As cubetas foram colocadas em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria.

Foram realizadas avaliações quanto a % de enraizamento, número e comprimento de raiz, comprimento da parte aérea e formação de calos. Nos experimentos 1 e 2, realizou-se apenas uma avaliação aos 30 dias para as espécies *M. illustris* e *A. arvense*. Para a espécie *M. velutina*, foram realizadas avaliações aos 30 e 60 dias. Nos experimentos 3 e 4, realizou-se avaliações aos 30 e 60 dias para todas as espécies em estudo. Nos demais experimentos, realizados somente com a espécie *M. velutina*, realizou-se uma avaliação aos 60 dias. Para a medição do comprimento das raízes e da parte aérea, utilizou-se uma régua.

3.2 DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson E INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE DIFERENTES GENÓTIPOS PARA A CONSERVAÇÃO EM BANCO DE GERMOPLASMA

3.2.1 Análise da diversidade genética

3.2.1.1 Coleta

Folhas de *M. velutina* foram coletadas no Estado de São Paulo, nos municípios de São Carlos (SC) e Pedregulho (PD) e no Estado de Minas Gerais, no município de Araxá (AR), compondo 67 indivíduos. Folhas jovens de cada acesso foram acondicionadas separadamente em tubos falcon devidamente identificados contendo sílica gel azul e posteriormente estocadas no freezer a - 2°C até o momento da extração.

A coleta foi aleatória e os dados de localização geográfica foram mapeados por Sistema de Posicionamento Global (GPS).

Uma exsicata foi depositada no Herbário de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (HMP – UNAERP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), sob o número nº 013.

3.2.1.2 Extração do DNA

O DNA genômico de folhas jovens foi isolado conforme protocolo proposto por Doyle & Doyle (1987); seguido de uma purificação, onde o DNA foi ressuspendido em 500µL de solução 1M de NaCl, onde permaneceu em banho-maria a 65°C por 5 min. Posteriormente, foi incubado a 4°C por 30 min e centrifugado a 12.000 G/5min. O sobrenadante contendo DNA foi transferido para um outro tubo no qual foi adicionado 350µL de isopropanol. Após 10 min de repouso, houve a precipitação e o material foi centrifugado a 12.000 G; 5min. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado duas vezes em etanol 70% seguido de centrifugação a 12.000 G/5min. Após uma hora de secagem a temperatura ambiente, o sedimento foi ressuspendido em 100µL de água miliQ.

O DNA extraído foi quantificado através da visualização da banda, sobre luz ultravioleta, em gel de agarose 1% (p/v) e corante de brometo de etídeo. Esse DNA foi comparado com DNA padrão (de fago lambda) de concentrações conhecidas.

3.2.1.3 Otimização do Protocolo de amplificação RAPD

As amostras de DNA de *M. velutina* foram avaliadas inicialmente com 100 iniciadores (Operon Life Technology e Biosynthesis Incorporated), dos quais foram selecionados 11 (Tabela 98). A partir do protocolo de amplificação de Ferreira & Gratapaglia (1998), diferentes concentrações dos seguintes componentes da reação foram testadas: enzima Taq polimerase (Pharmacia), (0,5 a 5,5 U, com intervalo de 0,5), cloreto de magnésio (Pharmacia), (20 a 65 mM, com intervalo de 5), DNA molde (5 a 55 ng, com intervalo de 5), iniciador (0 a 100 ng, com intervalo de 10) e diferentes temperaturas de anelamento de 39°, 40°, 41° e 45°C (termociclador M J Research, Inc., modelo PTC-100 Programmable Thermal Controller). Os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo. Marcadores de peso molecular de DNA (100 pb e 50 pb) foram adicionados em cada gel. Todos os reagentes utilizados foram da Amersham Biosciences do Brasil LTDA. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta (aparelho Image Master® VDS, Pharmacia Biotech). Somente as bandas reprodutíveis em diferentes análises foram consideradas. As amplificações fracas que eventualmente ocorreram foram excluídas. Amostras controle, contendo todos os produtos da reação exceto DNA, foram avaliadas para verificar a não auto-amplificação ou a presença de contaminantes. A partir da ausência ou presença de bandas amplificadas, confeccionou-se uma matriz binária.

3.2.1.4 Variabilidade genética dentro e entre populações

Os dados binários (presença ou ausência de bandas nos indivíduos) obtidos a partir do RAPD foram utilizados para estimar as frequências alélicas, com base na correção proposta por Lynch & Milligan (1994). Primeiramente foi realizada uma análise descritiva da variabilidade total calculando-se a porcentagem de locos polimórficos, a

diversidade de Nei (1973, 1978) e o índice de Shannon (Ashburner et al. 1997; Lewontin 1972, citado por Gauer & Cavalli-Molina 2000).

As distâncias genéticas de Nei (1978) foram utilizadas em uma análise de agrupamento do tipo UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method by Arithmetic Averages”) (Ferreira & Crattapaglia, 1998), mostrando a relação entre as populações.

A segunda forma de decompor a variância utilizada neste trabalho foi a AMOVA (Análise da Variância Molecular), conforme proposto por Excoffier et al (1992). Para tanto utilizou-se os programas TFGPA (Miller 1997), AMOVA-PREP 1.01 (Miller 1998) e WINAMOVA 1.04 (Excoffier, 1992), onde as frequências alélicas foram submetidas a uma análise de variância de frequências alélicas (Weir 1996; Telles, 2000), que permite a decomposição da variância genética total em seus componentes entre e dentro de populações, possibilitando a avaliação da estruturação da variabilidade.

3.2.2 Introdução dos genótipos *in vitro*

O desenvolvimento do protocolo adequado para o estabelecimento do banco de germoplasma *in vitro* de *M. velutina*, foi realizado por Biondo (2003).

Para a introdução dos genótipos *in vitro*, como explantes, foram utilizados segmentos nodais contendo uma gema axilar ou apical de plantas conservadas em casa de vegetação.

3.2.2.1 Assepsia

As plantas foram borrifadas com uma solução de Cercobin[®] (1%) + gentamicina[®] (80 mgL⁻¹), em água destilada, a cada 24 horas, durante uma semana.

Os segmentos nodais (1 cm) foram lavados com detergente para a retirada de contaminantes superficiais e colocados em água corrente por duas horas. Posteriormente, foram submergidos em solução de Cercobin[®] (0,2% p/v) por 24 h sob agitação de 80 rpm.

Após este tratamento, os explantes foram transferidos para solução de hipoclorito de cálcio (0,5% p/v) por 20 min e inoculados diretamente em meio MS basal + 2 gL⁻¹ de fitagel[®] (Murashige & Skoog, 1962), sem lavagem prévia em água.

Os explantes foram deixados em sala de crescimento onde realizou-se avaliações semanais quanto a porcentagem de contaminação durante quatro semanas.

3.3 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO MICORRÍZICA E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE MICORRIZA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. ex de Souza

3.3.1 Condições gerais do experimento

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Realizou-se a avaliação da infecção micorrízica nas raízes e a identificação de espécies de micorriza em populações naturais das três variedades de *A. arvense*, em diferentes locais de coleta.

Para avaliação da infecção micorrízica e identificação das espécies, foram utilizadas raízes de 10 plantas, coletadas juntamente com as amostras de solo, próximo ao sistema radicular.

3.3.2 Extração e observação microscópica de esporos do solo

Mediu-se 50 mL de solo em um becker e transferiu-se o conteúdo para um balde de plástico. Lavou-se o solo 4 vezes, agitando-o com um bastão de vidro e o sobrenadante foi passado nas peneiras de malhas 0,71 e 0,053mm, respectivamente. O material retido em cada peneira foi recolhido em beckers de 50mL e transferidos para os tubos de centrifugação, que foram balanceados e centrifugados por 3 min a 3000 rpm. Posteriormente, drenou-se o sobrenadante e adicionou-se solução de sacarose 50%. Agitou-se com um bastão, balanceou-se e centrifugou-se por 2 min a 2000 rpm. Drenou-se o sobrenadante em peneira

fina (0,053mm) e lavou-se rapidamente o material recolhido (esporos) com água, para eliminar o excesso de sacarose. O material foi transferido da peneira para placa de petri e observado em microscópio estereoscópico (ampliação 10 a 40x) para contagem dos esporos e montagem das lâminas.

As lâminas montadas foram levadas ao microscópio composto (ampliação 10 a 1000x), onde observou-se as dimensões do esporo e da hifa de sustentação, espessura e número de lâminas de parede celular, conteúdo citoplasmático e ornamentação da parede.

3.3.3 Extração, coloração e observação microscópica de infecção micorrízica nas raízes

Utilizou-se raízes mais novas e tenras que foram lavadas para retirada de solo e restos de matéria orgânica. Pesou-se 1 g de raízes limpas e colocou-as em cápsulas plásticas. As cápsulas contendo as raízes foram colocadas em becker contendo solução de KOH 10% e aquecidas em capela (90°C) por 1 h. Drenou-se o KOH e lavou-se com água. Posteriormente colocou-se água acidificada (HCl 1%) e agitou por 3 a 4 minutos. Verteu-se o HCL e colocou-se o corante Tripán blue. Aqueceu-se em capela (90°C) por 1 h e transferiu-se o material da cápsula para placa de petri.

As raízes coradas foram observadas em microscópio estereoscópico (ampliação 10 a 40x) para avaliação de porcentagem de colonização e montagem das lâminas.

As lâminas montadas foram observadas em microscópio composto (ampliação 10 a 1000x), quanto as estruturas presentes nas células (vesículas, arbúsculos, pelotão), espessuras das hifas e presença ou não de esporos na raiz.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. ex de Souza, *Mandevilla illustris* (Vell.) R. E. Woodson e *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson

1) Efeito do tempo de permanência das brotações em presença de NAA e IBA

As auxinas são os reguladores vegetais que estão diretamente envolvidos com a indução de raízes adventícias. No entanto, o seu efeito positivo pode ser significativamente diferente entre as espécies, porque, entre outros fatores, o genótipo também têm influência direta no processo de enraizamento.

Desse modo, os resultados obtidos com *M. illustris* e *M. velutina* foram significativamente diferentes, embora haja proximidade de parentesco entre as duas espécies.

Mandevilla illustris

A alternância da concentração da auxina e do tempo de permanência das brotações na sua presença aumentou consideravelmente o número de brotações de *M. illustris* enraizadas. No experimento realizado com NAA, pela avaliação realizada aos 30 dias, verificou-se que apenas 10% das brotações enraizaram quando cultivadas em meio sem a suplementação da auxina. A adição de 1 mgL^{-1} de NAA no meio, com tempo de permanência

de 15 dias, foi a melhor condição para o enraizamento, onde 73% das brotações apresentaram raízes, seguido de 4 e 6 mgL⁻¹ de NAA, com tempo de permanência de 15 dias, com 66,7% e 63,3% de enraizamento, respectivamente. Quando as brotações permaneceram durante 5 ou 30 dias em 2 mgL⁻¹ de NAA e 10 dias em 4 mgL⁻¹ de NAA, 57% apresentaram raízes. Nos demais tratamentos, a porcentagem de enraizamento foi menor ou igual a 53% (Tabela 1).

No experimento realizado com IBA, maiores porcentagens de enraizamento (47% e 43,3%), ocorreram nos tratamentos em que as brotações permaneceram por 10 dias em meio contendo 1 mgL⁻¹ de IBA e pelo período constante de 30 dias em meio contendo 6 mgL⁻¹ de IBA, respectivamente. Nos demais tratamentos, a porcentagem de enraizamento variou entre 10% e 30% (Tabela 1).

Os resultados obtidos com a análise de variância, mostraram que houve diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$), entre as concentrações de NAA, os diferentes tempos de permanência neste regulador vegetal e na interação NAA x tempo de permanência, para número e comprimento de raiz e comprimento da parte aérea de brotações de *M. illustris*, aos 30 dias de avaliação.

Com o desdobramento da interação, verificou-se que as brotações de *M. illustris* não apresentaram diferença estatística significativa para número de raiz, quando permaneceram em 0, 2 e 4 mgL⁻¹ de NAA, mas somente para as concentrações 1 e 6 mgL⁻¹ de NAA ($\alpha < 1$ e $\alpha < 5\%$).

Quando avaliou-se o comprimento das raízes nos diferentes tempos de permanência, para cada concentração de NAA, observou-se que houve diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$), para todas as concentrações testadas (1, 2, 4 e 6 mgL⁻¹) e somente o controle, foi não significativo.

No entanto, quando a característica avaliada foi o comprimento da parte aérea, durante os diferentes tempos de permanência, houve diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$), tanto para o controle, como para as concentrações 2, 4 e 6 mgL⁻¹ de NAA. Somente na concentração de 1 mgL⁻¹ de NAA, os resultados foram não significativos.

TABELA 1: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla illustris* em função de diferentes tempos de permanência em diferentes concentrações de ANA ou IBA, aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Efeito do tempo de permanência dos explantes em presença de NAA		Efeito do tempo de permanência dos explantes em presença de IBA	
TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO	TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO
0 - CONTROLE (MS/2)	10 ± 2,797	0 - CONTROLE (MS/2)	16,7 ± 2,996
1 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA - 5 dias	13,3 ± 1,704	1 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de IBA - 5 dias	13,3 ± 2,727
2 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA - 10 dias	43,3 ± 3,898	2 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de IBA - 10 dias	46,7 ± 4,041
3 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA - 15 dias	73,3 ± 4,024	3 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de IBA - 15 dias	16,7 ± 2,515
4 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA - 30 dias	53,3 ± 3,441	4 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de IBA - 30 dias	26,7 ± 3,296
5 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de NAA - 5 dias	56,7 ± 5,360	5 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de IBA - 5 dias	16,7 ± 2,515
6 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de NAA - 10 dias	43,3 ± 2,515	6 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de IBA - 10 dias	13,3 ± 3,895
7 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de NAA - 15 dias	53,3 ± 4,024	7 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de IBA - 15 dias	10 ± 1,808
8 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de NAA - 30 dias	56,7 ± 3,282	8 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de IBA - 30 dias	30 ± 3,509
9 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de NAA - 5 dias	43,3 ± 2,515	9 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de IBA - 5 dias	30 ± 3,509
10 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de NAA - 10 dias	56,7 ± 6,479	10 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de IBA - 10 dias	23,3 ± 1,388
11 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de NAA - 15 dias	66,7 ± 2,727	11 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de IBA - 15 dias	26,7 ± 5,013
12 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de NAA - 30 dias	40 ± 2,529	12 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de IBA - 30 dias	30 ± 4,600
13 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de NAA - 5 dias	43,3 ± 3,292	13 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de IBA - 5 dias	30 ± 4,600
14 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de NAA - 10 dias	50 ± 1,808	14 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de IBA - 10 dias	20 ± 2,119
15 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de NAA - 15 dias	63,3 ± 4,912	15 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de IBA - 15 dias	30 ± 2,809
16 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de NAA - 30 dias	46,7 ± 4,543	16 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de IBA - 30 dias	43,3 ± 3,898

As brotações podem apresentar um certo nível endógeno de auxina, que pode auxiliar na indução de raízes adventícias, quando submetidas à presença de auxinas exógenas, por reduzidos períodos. Para a espécie *M. illustris*, notou-se que, mesmo no tratamento controle, ou seja, o meio sem a presença de auxina, algumas brotações enraizaram; o que pode ser devido ao nível de auxina endógena. No entanto, nesta condição o número de brotações enraizadas foi consideravelmente baixo, porque o nível endógeno de auxina pode não ter sido suficiente para que as brotações apresentassem um número de raiz satisfatório com um comprimento adequado; sendo, portanto, necessário a presença de auxina exógena no meio de enraizamento. Quando isto acontece, a auxina exógena em complementação com a auxina endógena, promovem uma condição adequada em relação a concentração de auxinas na base do explante, e induzem a formação de raízes já nas primeiras etapas do processo.

Assim como a maior porcentagem de enraizamento, ocorreu quando as brotações permaneceram durante 15 dias em 1 mgL⁻¹ de NAA, o maior número e comprimento de raiz também foi obtido nestas mesmas condições.

De acordo com a Figura 4, pode-se observar os resultados quanto ao número de raiz de brotações de *M. illustris* em função do tempo de permanência em diferentes concentrações de NAA.

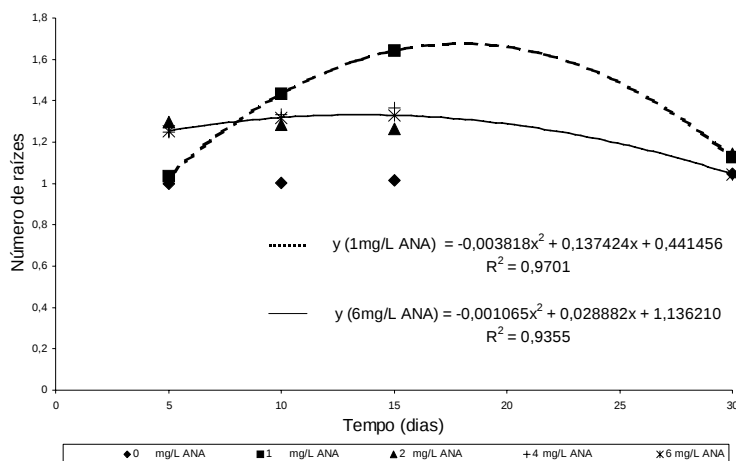


FIGURA 4: Número de raiz de brotações de *Mandevilla illustris* em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mgL⁻¹), aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Maior número de raiz foi obtido quando as brotações permaneceram durante 15 dias, nas concentrações de 1 e 6 mgL⁻¹ de NAA, sendo a concentração 1 mgL⁻¹ mais eficiente (1,6). Para a concentração 6 mgL⁻¹, as brotações apresentaram 1,3 raízes (Figura 4).

Períodos de permanência de 5 ou 10 dias, foram menos eficientes para estimular a indução de raízes. Quando as brotações permaneceram durante 5 dias na presença de 6 mgL⁻¹ de NAA, o número de raiz foi 1,2 e quando comparado a concentração de 1 mgL⁻¹ de NAA, foi 1. Mas quando o tempo de permanência foi de 10 dias, a concentração 1 mgL⁻¹ de NAA foi melhor e o número de raiz foi 1,4. Na concentração de 6 mgL⁻¹ de NAA o número de raiz foi 1,3 (Figura 4).

Como existe uma relação entre a necessidade de auxinas exógenas e as fases dependentes e/ou não dependentes de auxina para o crescimento de raízes, nota-se que, a condição ótima de enraizamento, é obtida quando se encontra a melhor relação entre a concentração testada e o tempo de permanência das brotações neste regulador (Figura 4).

Considerando o fato de determinadas brotações de *M. illustris* possuírem um certo nível endógeno de auxina, a suplementação do meio com baixas concentrações de NAA, já foi suficiente para que ocorresse o enraizamento. Reduzido período de tempo de exposição a auxina exógena, foi suficiente para estimular a conjugação entre o IAA endógeno e a auxina presente no meio de cultura, e conseqüentemente promover a indução das raízes. Desse modo, pode-se inferir que altas concentrações da auxina da auxina exógena, assim como longo período de tempo de exposição ao NAA, pode ter sido prejudicial e causado certa toxidez, inibindo o crescimento das raízes (Figura 4).

Para que se obtenha o máximo número de raiz (1,7), a condição ótima, é manter as brotações durante um período de 18 dias na concentração de 1 mgL⁻¹ de NAA (Figura 4).

De modo geral, se a concentração de auxina utilizada for relativamente alta (50 a 100 mgL⁻¹), as brotações devem permanecer por períodos menores que cinco dias. O uso de altas concentrações de auxinas exógenas, geralmente é realizado em trabalhos de enraizamento *ex vitro*, onde as microestacas permanecem por períodos de 24 ou 48 horas. Em trabalhos de enraizamento *in vitro*, é mais usual o emprego de concentrações menores (0,05 a

10 mgL⁻¹) e períodos maiores de exposição das brotações, como duas a três semanas, aproximadamente (McCown, 1988, Grattapaglia & Machado, 1998).

Para a indução de raízes nas brotações de *M. illustris*, pela Figura 4, pode-se observar que a maior concentração de NAA empregada (6 mgL⁻¹), só promoveu o maior número de raiz, para o menor período de tempo de permanência. No entanto, este número obtido aos 5 dias, não foi maior do que aqueles obtidos quando as brotações permaneceram na concentração de 1 mgL⁻¹ de NAA, em todos os outros de permanência. Nesse caso, a concentração de 6 mgL⁻¹ de NAA pode ter sido tóxica para as brotações que permaneceram por mais de 5 dias em contato com a auxina.

Os resultados obtidos neste experimentos com as brotações de *M. illustris*, estão de acordo com numerosos trabalhos que relatam o tempo de duas ou três semanas de exposição de plântulas em auxina exógena, como o mais adequado ao enraizamento de um vasto número de espécies (McCown, 1988; Negash *et al.*, 2000; Vengadesan, *et al.*, 2000; Majada *et al.*, 2000; Horváth, *et al.*, 2001; Radmann, *et al.*, 2002; Joshee *et al.*, 2002; Manickam, *et al.*, 2000; Bosa *et al.*, 2003; Nodoye *et al.*, 2003; Souza, *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2005).

Em relação ao comprimento de raiz, os resultados foram semelhantes aos obtidos para o número de raiz, haja vista que maiores comprimentos foram obtidos entre o período de 5 e 15 dias.

Quando as brotações permaneceram em meio de cultura contendo 1 mgL⁻¹ de NAA, as raízes cresceram 1 cm em 5 dias e 1,3 cm em 10 dias. Maior comprimento de raiz (1,46 cm), foi obtido quando as brotações permaneceram durante 15 dias em 1 mgL⁻¹ de NAA. A partir deste período, as raízes apresentaram um menor crescimento. Aos 30 dias, as raízes apresentaram 1,2 cm. Resultado semelhante, ocorreu quando as brotações permaneceram em 4 mgL⁻¹ de NAA. Para o tempo de permanência de 5 ou 10 dias, as raízes cresceram 1,2 e 1,38 cm, respectivamente. Maior comprimento (1,32 cm) foi obtido no tempo de permanência de 15 dias, decrescendo para 1,2 cm no período de permanência constante de 30 dias. Quando as brotações permaneceram em 2 mgL⁻¹ de NAA, o comprimento das raízes decresceu de acordo com o aumento do tempo de permanência. Maior comprimento (1,4 cm) para esta concentração, foi obtido quando as brotações permaneceram durante 5 dias. No tempo de permanência de 10, 15 e 30 dias, os resultados foram 1,23, 1,18 e 1,15 cm,

respectivamente. Na concentração de 6 mgL⁻¹ de NAA, o comprimento das raízes foi menor com o aumento do tempo de permanência. Maior comprimento (1,2 cm), foi obtido quando as brotações permaneceram durante 5 ou 10 dias, quando permaneceram durante 15 e 30 dias, os comprimentos foram 1,17 e 1,12 cm respectivamente (Figura 5).

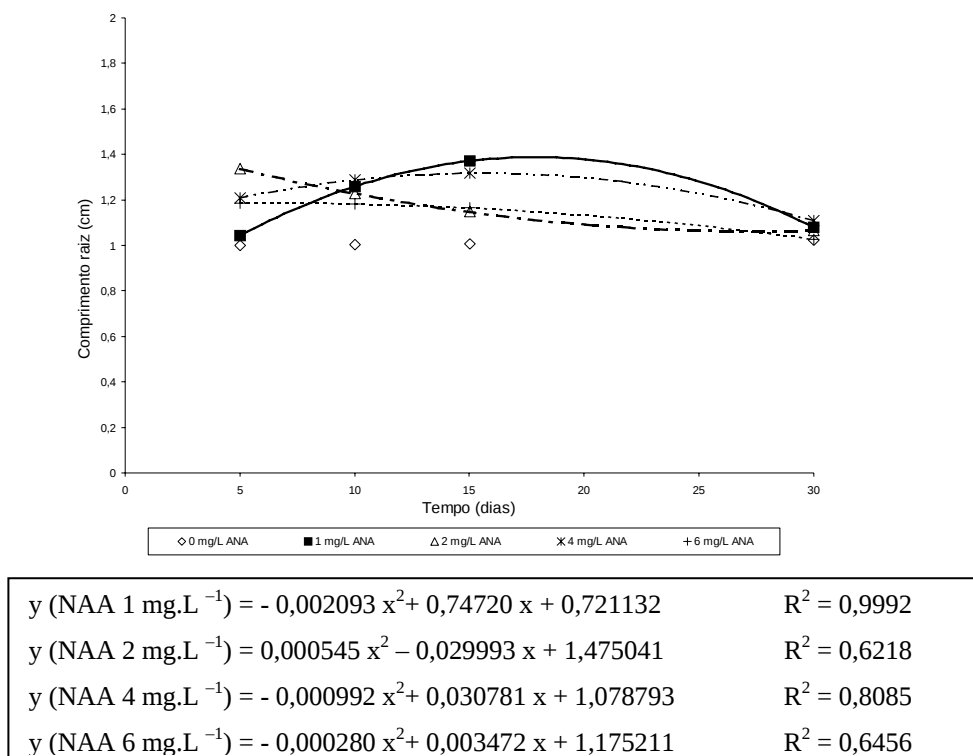


FIGURA 5: Comprimento de raiz (cm) de brotações de *Mandevilla illustris* em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mgL⁻¹), aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Do mesmo modo para a característica número de raiz, para que se obtenha o máximo comprimento de raiz (1,46 cm) nas brotações de *M. illustris*, estas devem permanecer durante um período de 18 dias, aproximadamente em meio contendo 1 mgL⁻¹ de NAA (Figura 5).

O crescimento da raiz pode ter sido inibido pela presença de auxina, durante um período superior a três semanas. Neste caso, da mesma forma para o número de raiz, pode ter ocorrido uma certa toxidez causada pela presença deste regulador, por um tempo

mais prolongado, visto que as raízes apresentaram um menor comprimento após o tempo de permanência de 15 dias na presença de NAA (Figura 5).

Em relação ao comprimento da parte aérea, pelos resultados obtidos na avaliação realizada aos 30 dias, verificou-se que as respostas foram diferentes quando comparados ao número e comprimento de raiz (Figura 6).

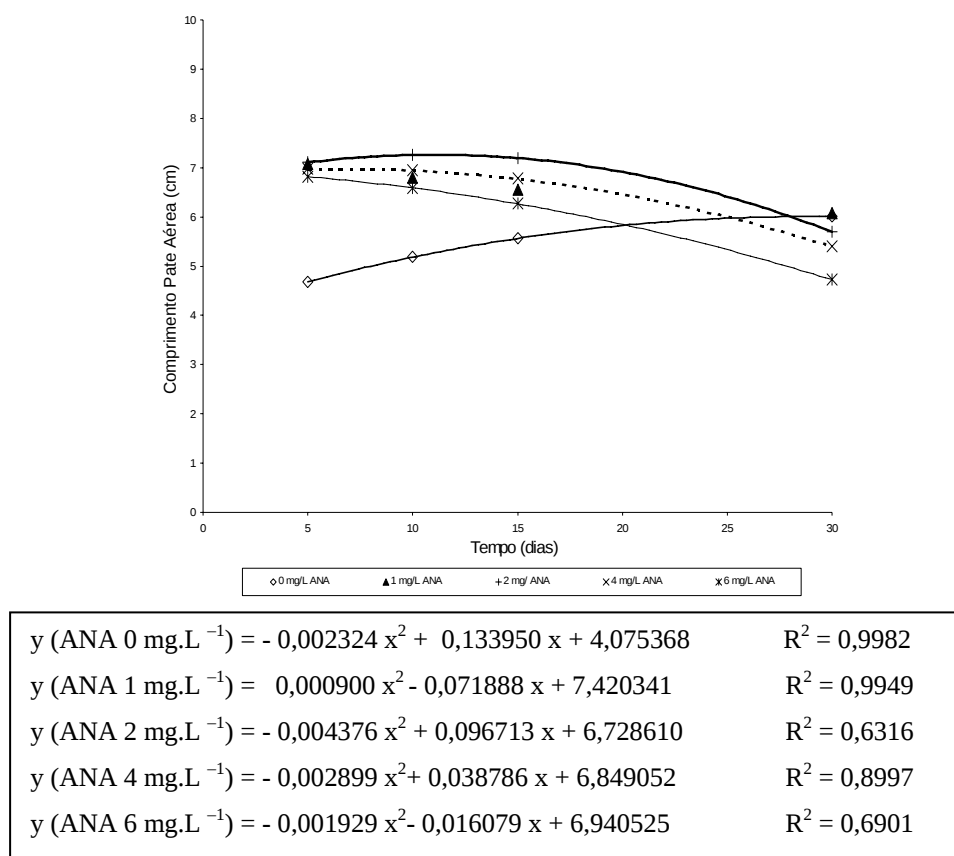


FIGURA 6: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de *Mandevilla illustris* em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mgL^{-1}), aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Para o tratamento controle, dentro do período de avaliação de 30 dias, não foi possível determinar o ponto máximo para obtenção do maior comprimento da parte aérea, ou seja, na ausência de auxina, a parte aérea cresceu até o final da data de avaliação.

Menor comprimento (4,5 cm) foi obtido no tempo de 5 dias e maior comprimento (6,5 cm), no tempo de 30 dias (Figura 6).

Maior comprimento da parte aérea (7,3 cm) foi obtido quando as brotações permaneceram durante 10 dias em 2 mgL^{-1} de NAA. Neste mesmo tempo de permanência, para as concentrações 1, 4 e 6 mgL^{-1} de NAA, os resultados foram 6,8; 7 e 6,6 cm, respectivamente. No tempo de permanência de 5 dias, as brotações apresentaram um comprimento da parte aérea de 7 cm para todas as concentrações. Quando foram cultivadas durante 15 dias em 1, 2, 4 e 6 mgL^{-1} de NAA, os resultados foram 6,5; 7,2; 6,8 e 6,3 cm, respectivamente. Quando permaneceram pelo período constante de 30 dias em 1, 2, 4 e 6 mgL^{-1} de NAA, os resultados foram 6,1; 5,7; 5,4 e 4,7 cm, respectivamente (Figura 6).

Sabe-se que além do enraizamento, as auxinas também estão relacionadas ao alongamento celular e conseqüentemente ao crescimento da parte aérea das plantas. Desse modo, pode-se observar na figura 6, que o comprimento da parte aérea foi maior quando as brotações de *M. illustris*, permaneceram por períodos entre 2 a 3 semanas na presença de NAA. No período constante de 30 dias, os resultados foram menores para todas as concentrações testadas.

Concentrações reduzidas de reguladores vegetais são sempre mais adequados aos protocolos de micropropagação, uma vez que a excessiva concentração de auxina no meio de cultura, além de provocar a formação de calos, na base das plântulas, podendo comprometer o enraizamento, compromete também o crescimento da parte aérea (Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001).

Menor comprimento (4,7 cm) foi obtido na maior concentração testada (6 mgL^{-1}), e quando as brotações permaneceram constante na presença de NAA.

Sabe-se que, além da concentração, o tipo de auxina empregada no meio de enraizamento é um dos fatores que também exerce efeito direto sobre a indução de raízes *in vitro*. A maior parte dos trabalhos de enraizamento *in vitro*, utilizam as auxinas NAA e IBA, devido a estabilidade em relação a outros reguladores vegetais, como por exemplo o IAA. No entanto, os resultados quanto ao efeito positivo e/ou negativo, destas auxinas, variam de modo significativo entre as espécies (Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001), como ocorrido para as espécies em estudo, porque o genótipo também influencia diretamente o processo de indução de raízes adventícias.

No experimento realizado com IBA, os resultados foram diferentes quanto a porcentagem de enraizamento, para a espécie *M. illustris*, como pode-se verificar na Tabela 1.

Os resultados obtidos na avaliação realizada aos 30 dias, pela análise de variância mostraram que somente as diferentes concentrações de IBA testadas, influenciaram significativamente ($\alpha < 1\%$), o número e comprimento de raiz das brotações de *M. illustris*. Para a característica comprimento da parte aérea, todas as variáveis analisadas apresentaram diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$). O desdobramento da interação IBA x DIAS, para comprimento da parte aérea, mostrou que houve diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$), somente quando as brotações permaneceram durante diferentes períodos em 1 e 4 mgL^{-1} de IBA, como também no controle.

Maior número de raiz (1,3), foi obtido na concentração de 6 mgL^{-1} de IBA, independente do tempo em que as brotações permaneceram em sua presença (Figura 7).

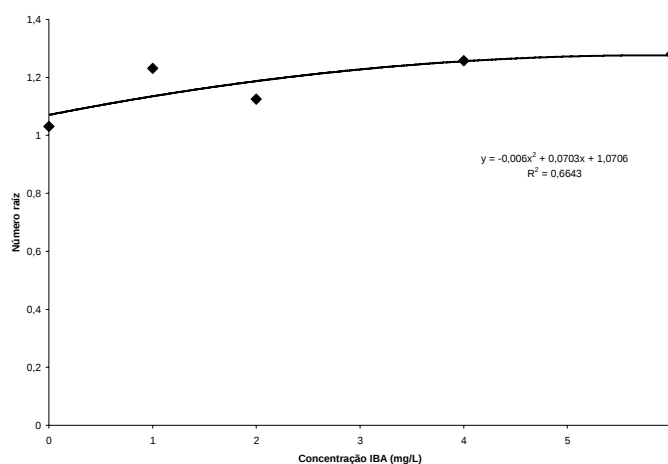


FIGURA 7 : Número de raiz de brotações de *Mandevilla illustris* em função da concentração de IBA (mgL^{-1}), aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Quando avaliou-se o comprimento das raízes, houve um crescimento à medida que se aumentou a concentração de IBA, até o ponto máximo de 5 mgL^{-1} . Nas concentrações de 1 e 2 mgL^{-1} , as raízes apresentaram em média, 1,08 e 1,11cm, respectivamente. O ponto ideal para obtenção do maior comprimento das raízes nesta auxina,

é na concentração $4,8 \text{ mgL}^{-1}$, onde apresentaram $1,14 \text{ cm}$ de comprimento, aproximadamente. Para maiores concentrações, o comprimento das raízes foi menor. Na concentração de 6 mgL^{-1} de IBA, as raízes cresceram $1,13 \text{ cm}$ (Figura 8).

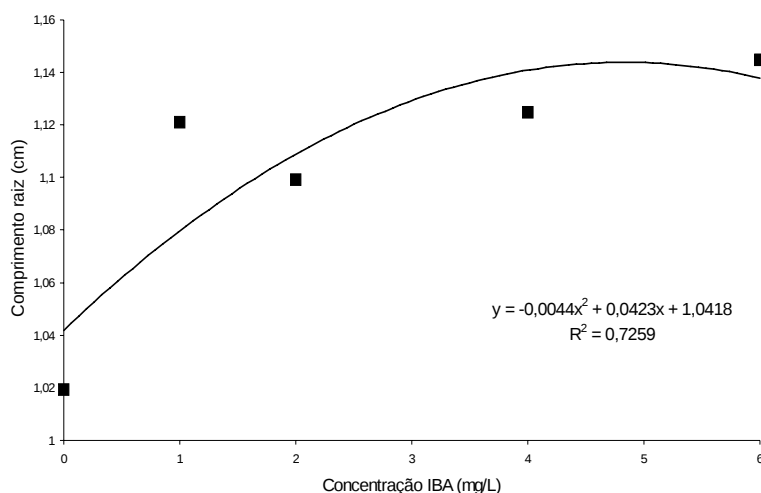


FIGURA 8: Comprimento de raiz de brotações de *Mandevilla illustris* em função da concentração de IBA (mgL^{-1}), aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Assim como para o número de raiz, para que se obtenha raízes com um comprimento adequado, concentrações maiores que 5 mgL^{-1} de IBA, devem ser evitadas, visto que em altas concentrações, pode ocorrer uma toxidez, prejudicando o adequado desenvolvimento das raízes *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998).

Para a característica comprimento da parte aérea, quando as brotações foram avaliadas na ausência de IBA, o seu comprimento aumentou até a última data de avaliação, assim como no experimento realizado com NAA. Menor comprimento ($4,5 \text{ cm}$) foi obtido no tempo de 5 dias e maior comprimento ($5,5 \text{ cm}$), no tempo de 30 dias. Quando as brotações permaneceram durante 5, 10, 15 dias, ou por período constante de 30 dias, na presença de 1 ou 4 mgL^{-1} de IBA, o comprimento da parte aérea não variou muito, permanecendo entre $5,8$ e 7 cm , aproximadamente. No entanto, o maior comprimento ($7,5 \text{ cm}$), foi obtido aos 30 dias em 4 mgL^{-1} de IBA (Figura 9).

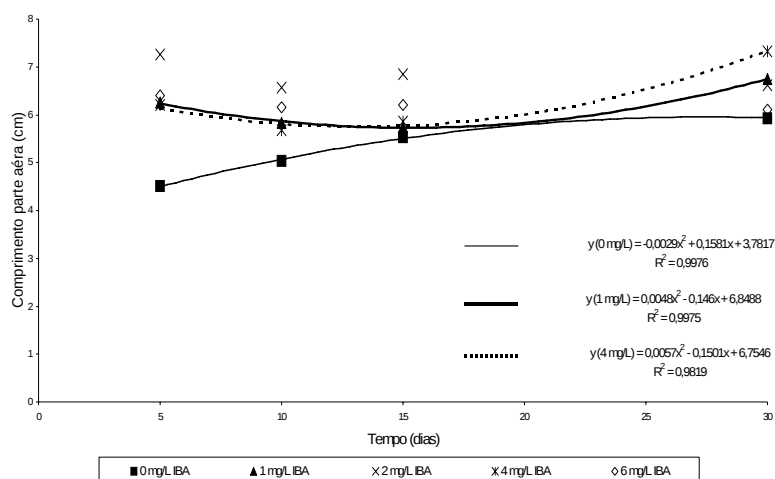


FIGURA 9: Comprimento da parte aérea de brotações de *Mandevilla illustris* em função da interação concentração de IBA (mgL^{-1}) x tempo de permanência, aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

De acordo com os resultados apresentados anteriormente, conclui-se que brotações de *M. illustris* enraizaram em meio sem a presença de auxina, contudo, a adição de IBA ou NAA, aumentou consideravelmente o número de brotações enraizadas, bem como, o número de raiz por brotação. O comprimento das raízes e da parte aérea, promovidos pela presença destas auxinas, também foram adequados ao posterior processo de aclimatização.

Todavia, mesmo que a presença de IBA tenha favorecido o enraizamento *in vitro* das brotações, os melhores resultados foram obtidos com o NAA, em uma concentração consideravelmente baixa (1 mgL^{-1}).

Bello *et al.*, (2002) também obtiveram bons resultados com NAA quando comparados ao IBA no enraizamento de *Valeriana glechmifolia*, uma planta medicinal, pois observaram que o meio suplementados com a primeira auxina, promoveu melhor enraizamento, além de produzir raízes morfológicamente similares às encontradas nas plantas a campo.

Nos trabalhos realizados por Souza *et al.*, (2004), com a espécie medicinal do cerrado *L. pinaster*, os resultados obtidos com enraizamento também mostraram melhores resultados para a auxina NAA quando comparada ao IBA.

Um dos efeitos negativos causados por auxinas é a formação de calos na base das brotações, podendo comprometer a formação de raízes funcionais. Geralmente, observa-se este efeito mais significativo para a auxina NAA (Grattapaglia & Machado, 1998), no entanto, os resultados são variáveis entre as espécies, e as auxinas IBA e IAA também podem induzir a formação de calos *in vitro* (Reddy *et al.*, 2001; Onay, 2000; Liu *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos com a *M. illustris*, corroboram com os dados obtidos com outras espécies, ou seja, o NAA promoveu maior formação de calos na base das plântulas, quando comparado ao IBA, no entanto, este não foi prejudicial à formação das raízes.

Uma outra característica da auxina NAA está relacionada a qualidade das raízes formadas *in vitro*, ou seja, estas geralmente apresentam-se mais grossas e sem ramificação, enquanto que as raízes formadas na presença de IBA, são mais finas e formam raízes laterais (Grattapaglia & Machado, 1998). Os resultados obtidos com a *M. illustris*, estão de acordo com a literatura, haja vista a formação de raízes mais grossas e a não formação de raízes laterais na presença de NAA nas brotações de *M. illustris*.

Ao comparar os dados obtidos neste trabalho e os resultados apresentados por Biondo *et al.*, (2004), com a *M. illustris*, pode-se concluir que houve um avanço considerável. No protocolo proposto por estes autores, o enraizamento foi de 29%, enquanto que nos experimentos demonstrados neste trabalho, a porcentagem foi 73%.

Mandevilla velutina

Os resultados obtidos nas avaliações realizadas aos 30 e 60 dias, mostraram que a porcentagem de enraizamento das brotações de *M. velutina* foi consideravelmente baixa para as duas auxinas testadas em todos os tratamentos. Aos 30 dias, 10% das brotações enraizaram quando permaneceram em 1 mgL⁻¹ de IBA durante 15 dias, seguido de 7%, quando permaneceram em 1 mgL⁻¹ de NAA durante 10 dias, ou 2 mgL⁻¹ de NAA durante 15 dias.

Aos 60 dias, 10% e 7% das brotações enraizaram quando permaneceram durante 15 dias na concentração de 2 mgL⁻¹ de NAA e por 10 dias e na concentração de 1 mgL⁻¹ de NAA, respectivamente. Nos outros tratamentos, a porcentagem de

enraizamento foi menor ou igual a 3,3%. No experimento realizado com IBA, aos 60 dias, os resultados permaneceram os mesmos, daqueles obtidos aos 30 dias (Tabelas 2 e 3).

TABELA 2: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla velutina* em função de diferentes tempos de permanência em diferentes concentrações de ANA aos 30 e 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Efeito do tempo de permanência dos explantes em presença de NAA		
TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO aos 30 dias	% ENRAIZAMENTO aos 60 dias
0 - CONTROLE (MS/2)	0 ± 0	0 ± 0
1 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA - 5 dias	0 ± 0	3,3 ± 1,347
2 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA - 10 dias	6,7 ± 2,735	6,7 ± 2,735
3 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA - 15 dias	0 ± 0	3,3 ± 1,347
4 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA - 30 dias	0 ± 0	0 ± 0
5 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de NAA - 5 dias	0 ± 0	3,3 ± 1,347
6 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de NAA - 10 dias	3,3 ± 1,347	3,3 ± 1,347
7 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de NAA - 15 dias	6,7 ± 2,735	10 ± 4,0825
8 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de NAA - 30 dias	0 ± 0	3,3 ± 1,347
9 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de NAA - 5 dias	0 ± 0	3,3 ± 1,347
10 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de NAA - 10 dias	0 ± 0	0 ± 0
11 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de NAA - 15 dias	0 ± 0	0 ± 0
12 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de NAA - 30 dias	0 ± 0	0 ± 0
13 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de NAA - 5 dias	3,3 ± 1,347	0 ± 0
14 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de NAA - 10 dias	0 ± 0	3,3 ± 1,347
15 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de NAA - 15 dias	3,3 ± 1,347	3,3 ± 1,347
16 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de NAA - 30 dias	0 ± 0	0 ± 0

TABELA 3: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla velutina* em função de diferentes tempos de permanência em diferentes concentrações de IBA aos 30 e 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Efeito do tempo de permanência dos explantes em presença de IBA		
TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO aos 30 dias	% ENRAIZAMENTO aos 60 dias
0- CONTROLE (MS/2)	0 ± 0	0 ± 0
1 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de IBA - 5 dias	0 ± 0	0 ± 0
2 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de IBA – 10 dias	3,3 ± 1,347	3,3 ± 1,347
3 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de IBA – 15 dias	10 ± 2,797	10 ± 2,797
4 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de IBA – 30 dias	0 ± 0	0 ± 0
5 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de IBA - 5 dias	0 ± 0	0 ± 0
6 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de IBA – 10 dias	3,3 ± 1,347	3,3 ± 1,347
7 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de IBA – 15 dias	0 ± 0	0 ± 0
8 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de IBA – 30 dias	0 ± 0	0 ± 0
9 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de IBA - 5 dias	0 ± 0	0 ± 0
10 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de IBA – 10 dias	0 ± 0	0 ± 0
11 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de IBA – 15 dias	0 ± 0	0 ± 0
12 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de IBA – 30 dias	0 ± 0	0 ± 0
13 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de IBA – 5 dias	0 ± 0	0 ± 0
14 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de IBA – 10 dias	0 ± 0	0 ± 0
15 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de IBA – 15 dias	3,3 ± 1,347	3,3 ± 1,347
16 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de IBA – 30 dias	0 ± 0	0 ± 0

Comparando os resultados obtidos com a *M. velutina* com a *M. illustris*, nota-se claramente a influência direta do genótipo no processo de enraizamento, haja vista que as condições para a realização dos experimentos foram as mesmas.

Os resultados obtidos com as espécies em estudo, corroboram com os numerosos trabalhos realizados com o objetivo de mostrar que fatores genéticos estão ligados diretamente à capacidade de determinadas espécies formar ou não raízes adventícias (Haissig & Riemenschneider, 1988; Yepes & Aldwinckle, 1994; Assis & Teixeira, 1998; Leonardi *et al.*, 2001; Syros *et al.*, 2004).

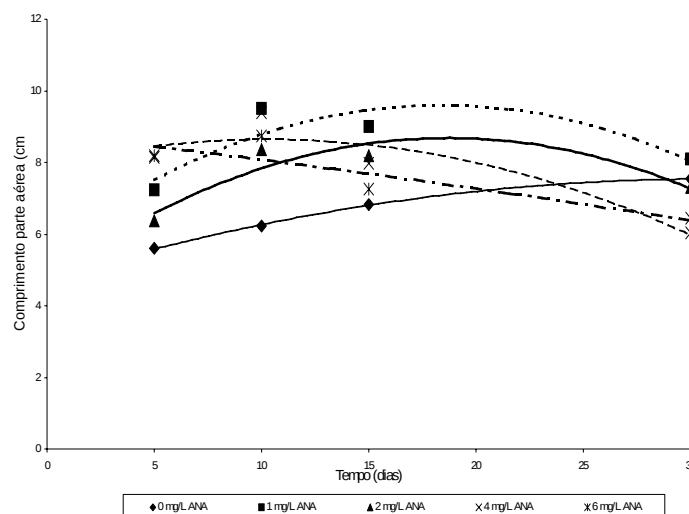
Assim como para *M. illustris* e *M. velutina*, algumas diferenças relacionadas a indução de raízes adventícias *in vitro* e genótipo também foram observadas por Cuenca & Amo-Marco (2000), quando estudaram a micropropagação de *Salvia valentina* e *S. blancoana*. O uso de diferentes concentrações de NAA, IAA e IBA resultaram em

significativa diferença quanto a porcentagem de enraizamento, número e comprimento das raízes entre as duas espécies. *S. valentina* foi mais sensível ao NAA, visto que maiores concentrações inibiram a formação de raízes, o que não ocorreu com *S. blancoana*.

Quando Polanco & Ruiz (2001) estudaram a indução de raízes adventícias *in vitro* de quatro cultivares de *Lens culinaris*, também observaram significativa diferença na porcentagem de enraizamento de acordo com os diferentes genótipos. Assim como, resultados semelhantes foram obtido por Pierik *et al.*, (1997) com diversos genótipos de *Quercus robur* e por Rogalski *et al.*, (2003) com diferentes porta-enxertos de *Prunus*.

Os resultados obtidos com a análise de variância, mostraram que tanto o número quanto o comprimento das raízes, não apresentaram diferença estatística significativa entre as concentrações de NAA, os tempos de permanência e na interação NAA x tempo de permanência. Aos 30 dias, houve diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$), somente para comprimento da parte aérea para estas variáveis. O desdobramento da interação concentração de NAA x tempo de permanência, mostrou que esta diferença foi significativa, para todas as concentrações testadas ($\alpha < 1\%$).

Quando as brotações de *M. velutina* foram avaliadas na ausência de NAA em diferentes tempos, o comprimento da parte aérea aumentou até a data final da avaliação, de modo semelhante ao que ocorreu nos experimentos realizados com *M. illustris*. Menor comprimento (5 cm) foi obtido no tempo de 5 dias e maior comprimento (7cm), no tempo de 30 dias. Quando as brotações permaneceram na presença de 1 e 2 mgL⁻¹ de NAA, o comportamento para esta característica foi semelhante para as duas concentrações. O comprimento da parte aérea aumentou até o tempo de permanência de 15 dias aproximadamente, sendo menor após este período. Maior comprimento foi obtido quando as brotações permaneceram em 1 mgL⁻¹ de NAA (9 cm), seguido de 2 mgL⁻¹ de NAA (8,5 cm). Quando as brotações permaneceram em concentrações maiores que 4 ou 6 mgL⁻¹ de NAA, maior comprimento da parte aérea (8,5cm), foi obtido no tempo de permanência de 5 dias (Figura 10).



$y \text{ (ANA } 0 \text{ mg.L}^{-1}) = -0,002923 x^2 + 0,180516x + 4,751427$	$R^2 = 0,9982$
$y \text{ (ANA } 1 \text{ mg.L}^{-1}) = -0,011621x^2 + 0,428085x + 5,668508$	$R^2 = 0,7283$
$y \text{ (ANA } 2 \text{ mg.L}^{-1}) = -0,011158 x^2 + 0,417947x + 4,769346$	$R^2 = 0,8272$
$y \text{ (ANA } 4 \text{ mg.L}^{-1}) = -0,006825 x^2 + 0,140055 x + 7,923665$	$R^2 = 0,8406$
$y \text{ (ANA } 6 \text{ mg.L}^{-1}) = -0,000438 x^2 - 0,067366 x + 8,805801$	$R^2 = 0,7843$

FIGURA 10: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de *Mandevilla velutina* em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mg.L^{-1}), aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Como as brotações não apresentaram raiz no tempo de 30 dias, realizou-se uma nova avaliação aos 60 dias. Entretanto, os resultados permaneceram os mesmos. Tanto o número quanto o comprimento das raízes, não apresentaram diferença estatística significativa entre as diferentes concentrações de NAA testadas, diferentes tempos de permanência, como também, na interação NAA x tempo de permanência. Somente para comprimento da parte aérea, houve diferença estatística ($\alpha < 1\%$). Todavia, o desdobramento da interação concentração de NAA x tempos de permanência, mostrou que somente as concentrações de 4 e 6 mg.L^{-1} de NAA, apresentaram diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$).

Maior comprimento da parte aérea foi obtido quando as brotações permaneceram na presença da auxina por períodos menores de 5 ou 10 dias. O comprimento

da parte aérea obtido nas duas concentrações entre 5 e 15 dias, ficou entre 9 e 10 cm, 8,5 cm em 6 mgL^{-1} de NAA e 5 cm em 4 mgL^{-1} de NAA (Figura 11).

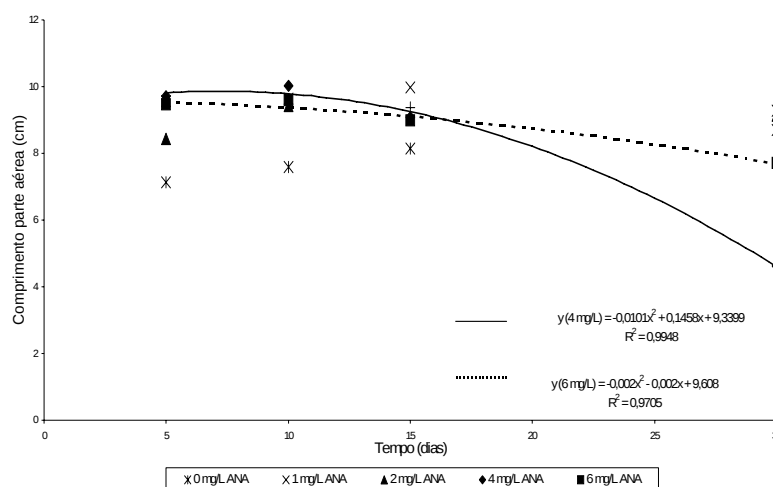


FIGURA 11: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de *Mandevilla velutina* em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mgL^{-1}), aos 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Quando as brotações de *M. velutina* foram avaliadas nas mesmas condições em presença de IBA, os resultados foram semelhantes ao NAA. Aos 30 dias, as brotações também não apresentaram raízes na presença desta auxina e somente o comprimento da parte aérea apresentou diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$), para concentrações de IBA e para a interação concentrações de IBA x tempo de permanência. O desdobramento da interação, mostrou que o efeito de cada concentração de IBA em diferentes tempos de permanência só não foi significativo para o comprimento da parte aérea das brotações de *M. velutina*, na concentração de 2 mgL^{-1} de IBA.

A concentração de 1 mgL^{-1} de IBA com 20 dias de permanência, foi a condição que permitiu a obtenção do maior comprimento da parte aérea (8,5 cm) de brotações de *M. velutina*. Aos 5, 10 e 15 dias de permanência, o comprimento da parte aérea foi de 6, 7 e 8 cm respectivamente. Quando as brotações permaneceram pelo período constante de 30 dias a partir do vigéssimo dia, o comprimento da parte aérea foi 7 cm. As brotações de *M. velutina*

inoculadas na ausência de IBA cresceram até a data de avaliação final, do mesmo modo como ocorreu nos experimentos realizados com NAA com *M. illustris*. Menor comprimento (5,5cm) foi obtido no tempo de 5 dias e o maior comprimento (7 cm) no tempo de 30 dias. Quando as brotações permaneceram na presença de 4 mgL⁻¹ de IBA, o comprimento da parte aérea obtido no tempo de permanência de 5 dias foi 7 cm e 5,5 cm, aproximadamente no tempo de permanência constante na presença da auxina. Quando as brotações permaneceram na presença de 6 mgL⁻¹ de IBA, por período constante de 30 dias, obteve-se maior comprimento da parte aérea (7,5 cm) (Figura 12).

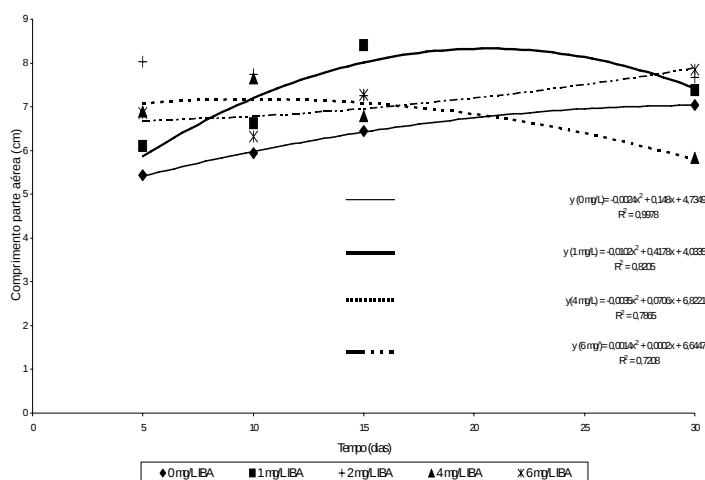


FIGURA 12: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de *Mandevilla velutina* em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de IBA (mgL⁻¹), aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Como as brotações de *M. velutina* também não apresentaram raiz após permanecerem por 30 dias no meio de cultura suplementado com IBA, realizou-se uma nova avaliação aos 60 dias. Entretanto, os resultados permaneceram os mesmos, ou seja, não houve enraizamento. Somente para comprimento da parte aérea, houve diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$), para concentração de IBA, diferentes tempos de permanência e na interação IBA x tempo de permanência.

Os resultados do desdobramento da interação concentração de IBA x tempo de permanência obtidos pela análise de variância, mostraram que apenas na ausência de IBA e na concentração de 1 mgL^{-1} , houve diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$).

Aos 60 dias, a concentração de 1 mgL^{-1} de IBA e tempo de permanência de 20 dias, também foi a condição que promoveu o maior comprimento da parte aérea (9,5cm) em brotações de *M. velutina*. Aos 5, 10 e 15 dias de permanência, o comprimento da parte aérea foi de 5, 8 e 8,7 cm aproximadamente. As brotações apresentaram um comprimento de 8,2 cm, quando permaneceram pelo período constante de 30 dias. Quando foram avaliadas na ausência de IBA em diferentes tempos, pode-se observar do mesmo modo que o comprimento da parte aérea aumentou entre 5 e 30 dias. Menor comprimento da parte aérea (6cm) foi obtido no tempo de 5 dias e maior comprimento (7,5 cm), no tempo de 30 dias (Figura 13).

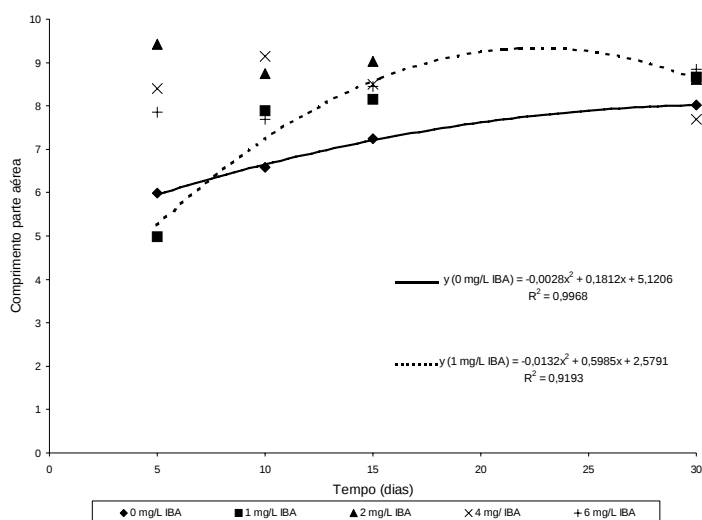


FIGURA 13: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de *Mandevilla velutina* em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de IBA (mgL^{-1}), aos 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Diferentes concentrações e tipos de auxinas, bem como os diferentes tempos de permanência das brotações na presença destes reguladores de crescimento, não foram

eficientes para promover o enraizamento *in vitro* de brotações de *M. velutina*. Nesse caso, outras substância devem ser testadas.

No entanto, os dados quanto ao comprimento da parte aérea, podem ser importantes, visto que a obtenção de bom desenvolvimento da parte aérea poderá contribuir para formação de auxinas endógenas e outros compostos necessários ao enraizamento. A concentração de 1 mgL⁻¹ de IBA e tempo de permanência de 15 dias, permitiu a obtenção de resultados satisfatórios para porcentagem de enraizamento e comprimento da parte aérea. Sendo assim, esta informação deve ser considerada importante e nortear os demais experimentos a serem instalados para esta espécie.

Assim como para a espécie *M. illustris*, ocorreu a formação de calos na base das plântulas, no entanto, este não foi prejudicial à formação de raízes nas brotações que enraizaram.

Durante a fase de indução e iniciação de raízes, o processo é regulado principalmente por níveis endógenos e exógenos de auxina e/ou outras substâncias. A relação que existe entre os níveis de auxina endógena e a habilidade para iniciar raízes, refere-se principalmente ao nível de ácido indol acético (IAA), por ser o principal hormônio endógeno que age como um ativador de gene alavancando a formação do primórdio radicular. Alguns autores afirmam que para que ocorra a iniciação de raízes adventícias primordiais, é necessário um alto nível de auxinas endógenas (Gaspar & Hofinger, 1988; Ono & Rodrigues, 1996; Ford, *et al.*, 2001).

A maioria dos trabalhos de enraizamento *in vitro*, tem confirmado a ação positiva de auxinas nas fases de indução e iniciação em períodos de duas, três e/ou quatro semanas aproximadamente, bem como, mostrado a importância da relação concentração de auxina/tempo de permanência, e da toxidez que pode ocorrer na etapa do crescimento das raízes, se as brotações permanecerem durante um longo período na presença de auxinas.

Vários trabalhos têm sido realizado neste contexto, como pode ser verificado para as espécies *Gypsophila paniculata*, *Ensete ventricosum*, *Withania somnifera*, *Artocarpus lakoocha* Roxb, *Ilex aquifolium*, *Eugenia javanica* LAM, *Balanites aegyptiaca*, *Acacia mangiu* e *Lychnophora pinaster* (Bosa *et al.*, 2003; Negash *et al.*, 2000; Manickam, *et al.* 2000; Joshee *et al.*, 2002; Majada *et al.*, 2000; Kataoka & Inoue, 1993; Nodoye *et al.*, 2003; Xie & Hong, 2001, Souza, *et al.*, 2004).

Em espécies consideradas difíceis de enraizar, após o tratamento com auxinas sintéticas, ocorre um aumento na concentração de IAA endógeno e posteriormente um rápido decréscimo, antes da formação das raízes, não ocorrendo a conjugação com a auxina exógena para a formação do primórdio radicular (Gaspar & Hofinger, 1988; Ford, *et al.*, 2001; Aloufa, 2003).

A espécie *M. velutina*, pode ser considerada uma espécie difícil de enraizar porque de acordo com os dados apresentados anteriormente, verificou-se que esta técnica não foi suficiente para promover o enraizamento das plântulas *in vitro*. Desse modo, pode-se inferir que a espécie *M. velutina*, diferentemente da *M. illustris*, não deve possuir um nível de auxina endógena satisfatório, que favoreça a conjugação com a auxina exógena quando presente no meio de enraizamento.

Como pode ser observado nos gráficos apresentados anteriormente, períodos prolongados de exposição as auxina, não promoveram toxidez nas plântulas de *M. velutina*. Nesse caso, em outros experimentos, a conjugação de duas auxinas, bem como concentrações mais elevadas, acima de 10 mgL^{-1} , poderão ser testadas.

Anemopaegma arvense

Para a espécie *A. arvense*, os resultados obtidos, também foram diferentes para as duas auxinas testadas, assim como para *M. velutina* e *M. illustris*. No experimento realizado com NAA, na avaliação realizada aos 30 dias, nenhuma brotação enraizou quando cultivada em meio sem a suplementação da auxina. Assim como para a espécie *M. illustris*, a alternância da concentração da auxina e tempo de permanência, aumentou consideravelmente a porcentagem de brotações enraizadas, o número e o comprimento das raízes. A suplementação do meio com 2 mgL^{-1} de NAA e o tempo de permanência de 15 dias, foi a melhor condição para o enraizamento, onde 50% das brotações enraizaram. Quando as brotações permaneceram durante 30 dias na presença de 1 mgL^{-1} de NAA, 23,3% apresentaram raiz. Nos demais tratamentos, a porcentagem de enraizamento foi menor que 20% (Tabela 4).

Quando as brotações foram cultivadas na presença de IBA, os resultados foram diferentes. Para esta espécie, a auxina IBA, também pode ter um efeito

menos tóxico quando comparada ao NAA, visto que maior porcentagem de enraizamento (27%), foi obtido quando as brotações permaneceram durante todo o tempo na presença da maior concentração da auxina testada, ou seja, 30 dias em 4 mgL^{-1} de IBA, seguido de 23% quando cultivadas durante 30 dias na presença de 1 mgL^{-1} de IBA. Nos demais tratamentos, a porcentagem de enraizamento foi menor de 20% (Tabela 4).

TABELA 4: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Anemopaegma arvense* em função de diferentes tempos de permanência em diferentes concentrações de ANA ou IBA, aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Efeito do tempo de permanência dos explantos em presença de NAA		Efeito do tempo de permanência dos explantos em presença de IBA	
TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO	TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO
0 - CONTROLE (MS/2)	0 ± 0	0 - CONTROLE (MS/2)	0 ± 0
1 - MS/2 + 1 mgL^{-1} de NAA - 10 dias	$6,7 \pm 2,727$	1 - MS/2 + 1 mgL^{-1} de IBA - 10 dias	0 ± 0
2 - MS/2 + 1 mgL^{-1} de NAA - 15 dias	$13,3 \pm 3,460$	2 - MS/2 + 1 mgL^{-1} de IBA - 15 dias	0 ± 0
3 - MS/2 + 1 mgL^{-1} de NAA - 30 dias	$23,3 \pm 5,333$	3 - MS/2 + 1 mgL^{-1} de IBA - 30 dias	$23,33 \pm 5,039$
4 - MS/2 + 2 mgL^{-1} de NAA - 10 dias	$10 \pm 1,808$	4 - MS/2 + 2 mgL^{-1} de IBA - 10 dias	0 ± 0
5 - MS/2 + 2 mgL^{-1} de NAA - 15 dias	$50 \pm 3,292$	5 - MS/2 + 2 mgL^{-1} de IBA - 15 dias	$10 \pm 1,808$
6 - MS/2 + 2 mgL^{-1} de NAA - 30 dias	$3,3 \pm 1,347$	6 - MS/2 + 2 mgL^{-1} de IBA - 30 dias	$3,3 \pm 1,347$
7 - MS/2 + 4 mgL^{-1} de NAA - 10 dias	$13,3 \pm 2,515$	7 - MS/2 + 4 mgL^{-1} de IBA - 10 dias	$6,6 \pm 1,704$
8 - MS/2 + 4 mgL^{-1} de NAA - 15 dias	$10 \pm 1,808$	8 - MS/2 + 4 mgL^{-1} de IBA - 15 dias	$6,6 \pm 1,704$
9 - MS/2 + 4 mgL^{-1} de NAA - 30 dias	$16,7 \pm 2,996$	9 - MS/2 + 4 mgL^{-1} de IBA - 30 dias	$26,7 \pm 3,454$

Os resultados obtidos através da análise de variância na avaliação realizada aos 30 dias, mostraram que houve diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$) para número e comprimento das raízes somente na interação concentração de NAA x tempo de

permanência. Para o comprimento da parte aérea, a diferença estatística foi significativa ($\alpha < 1\%$), somente entre as diferentes concentrações de NAA testadas.

O desdobramento da interação de cada concentração de NAA nos diferentes tempos de permanência, para número e comprimento de raiz, mostrou que houve influência do tempo de permanência somente na concentração de 2 mgL⁻¹ de NAA ($\alpha < 1\%$). As brotações de *A. arvense*, não apresentaram diferença estatística significativa quando permaneceram por diferentes tempos em 1 e 4 mgL⁻¹ de NAA.

Para o número de raiz das brotações de *A. arvense*, assim como para a espécie *M. illustris*, os resultados obtidos também estão de acordo com a literatura sobre o tempo de permanência de 2 ou 3 semanas na presença de auxina exógena, como as condições mais adequadas para induzir o enraizamento *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998), (Figura 14).

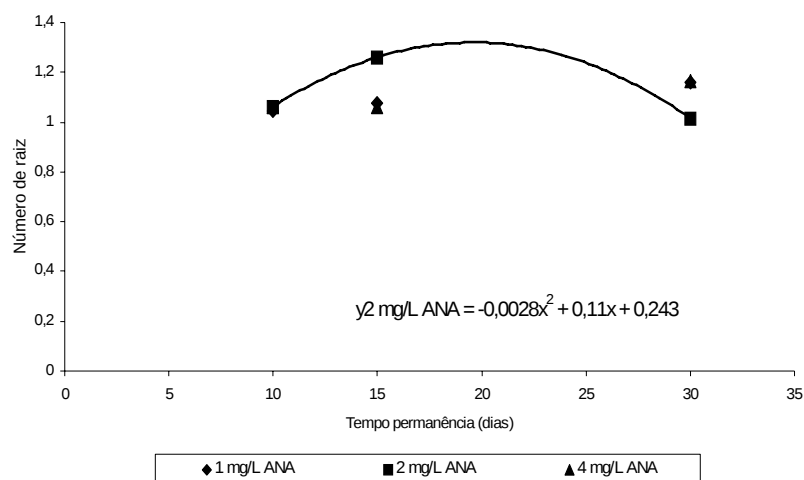


FIGURA 14: Número de raiz de brotações de *Anemopaegma arvense* em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mgL⁻¹), aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Na interação concentração de NAA x tempo de permanência, a concentração de 2 mgL⁻¹ de NAA no tempo de permanência de 15 dias, além de ter promovido maior porcentagem de brotações enraizadas, também foi a condição que promoveu a melhor

resposta para número de raiz (1,25). Quando as brotações foram cultivadas nesta concentração no tempo de permanência de 10 dias ou na presença constante da auxina, as respostas foram 1,06 e 1,01 raiz, respectivamente. Quando as brotações permaneceram por período constante de 30 dias, o número de raiz foi 1 (Figura 14).

Assim como para a característica número de raiz, o comprimento das raízes, tiveram comportamento semelhante. A concentração de 2 mgL^{-1} de NAA e o tempo de permanência de 15 dias, foi o melhor tratamento, visto que as raízes apresentaram 1,25 cm. No tempo de permanência de 10 dias ou tempo constante de 30 dias, os resultados foram 1,04 e 1,0 cm, respectivamente (Figura 15).

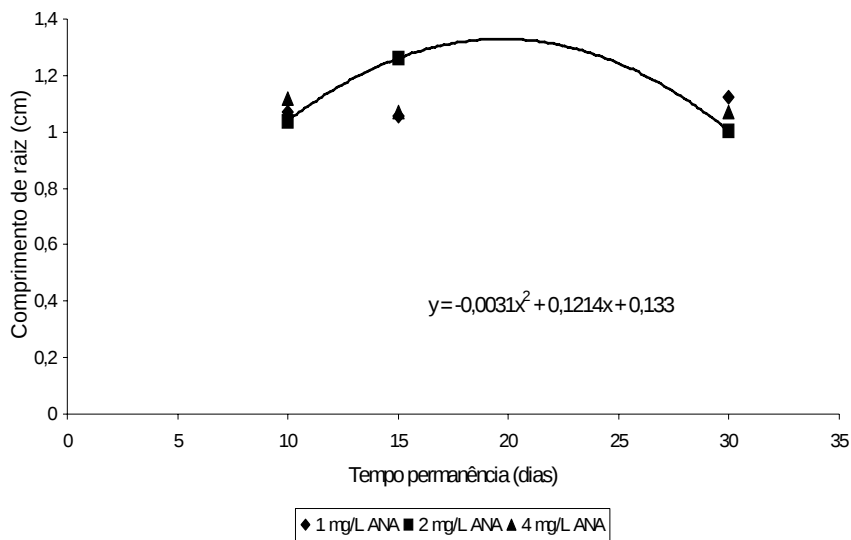


FIGURA 15: Comprimento de raiz (cm) de brotações de *Anemopaegma arvense* em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mgL^{-1}), aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Esses resultados estão de acordo a literatura, haja vista que o alongamento e/ou crescimento das raízes, pode ser inibido, quando estas permanecem durante todo o tempo na presença de auxina (Grattapaglia & Machado, 1998).

Quando avaliou-se o comprimento da parte aérea, nas diferentes concentrações de NAA testadas, pode-se observar pela Figura 16, que os melhores resultados

foram obtidos na concentração de 2 mgL^{-1} de NAA, onde as brotações apresentaram 5 cm de comprimento, aproximadamente. Menor comprimento (4,54 cm) foi obtido na concentração de 1 mgL^{-1} de NAA e quando as brotações foram cultivadas na presença de 4 mgL^{-1} de NAA, o comprimento foi de 4,7 cm.

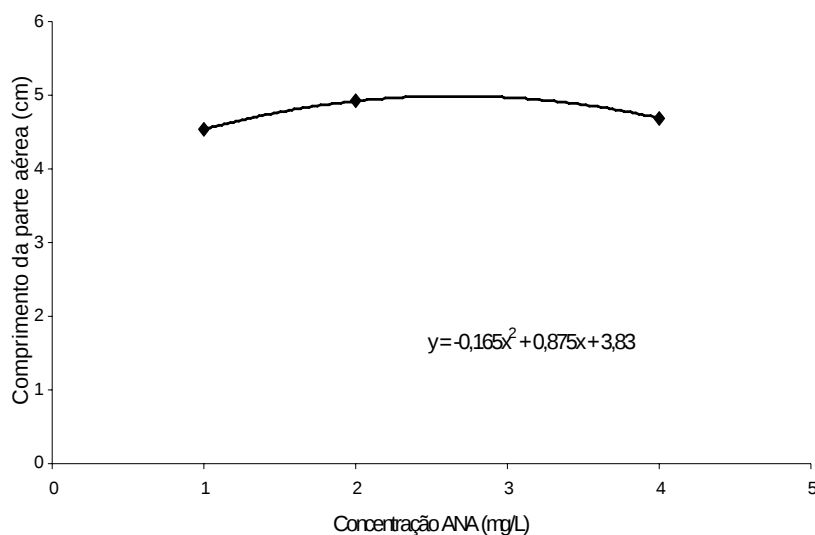


FIGURA 16: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de *Anemopaegma arvense* em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mgL^{-1}), aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

O efeito de diferentes tipos de auxinas exógenas sobre a indução de raízes *in vitro*, é significativamente variável entre as espécies, e algumas auxinas como o NAA, podem mesmo apresentar um efeito mais tóxico quando comparado ao IBA (Grattapaglia & Machado, 1998; Souza *et al.*, 2004).

Quando as brotações de *A. arvense* foram cultivada na presença de IBA, de acordo com a avaliação realizada aos 30 dias, os resultados obtidos com a análise de variância, mostraram que somente as concentrações de IBA não influenciaram significativamente o comprimento das raízes das brotações de *A. arvense*. Houve diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$), para número e comprimento das raízes e o comprimento da parte aérea para todas as outras variáveis analisadas.

O desdobramento do efeito da interação de cada concentração de IBA x tempo de permanência, para número e comprimento de raiz e comprimento da parte aérea, das brotações de *A. arvense*, mostrou que houve diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$), somente nas concentrações de 1 e 4 mgL⁻¹ de IBA.

O comportamento para a característica número de raiz, foi semelhante para as duas concentrações (1 e 4 mgL⁻¹ de IBA). Maiores números de raízes (1,24 e 1,21), foram obtidos quando as brotações permaneceram durante 30 dias na presença de 4 mgL⁻¹ e 1 mgL⁻¹ de IBA. Quando permaneceram durante 10 dias na presença de 1 ou 4 mgL⁻¹ de IBA, e 15 dias na presença de 1 mgL⁻¹ de IBA o resultado foi de 1,02 raízes. Quando permaneceram durante 15 dias em 4 mgL⁻¹ de IBA, o resultado foi de 1,08 raízes (Figura 17).

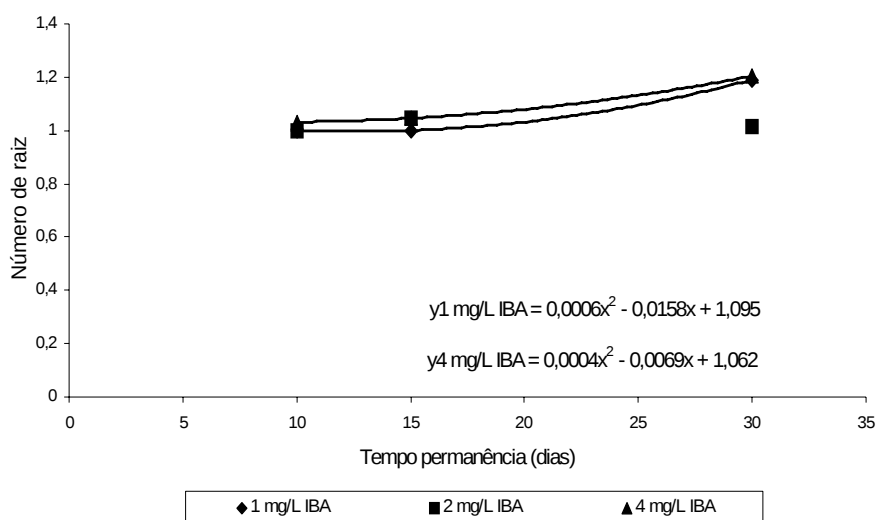


FIGURA 17: Número de raiz de brotações de *Anemopaegma arvense* em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de IBA (mgL⁻¹), aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Os resultados obtidos para o comprimento de raiz, foram semelhantes, ao número de raiz. Maior comprimento (1,21 cm), foi obtido quando as brotações permaneceram durante 30 dias na presença de 4 mgL⁻¹ de IBA, seguido de 1,15 cm, quando cultivadas nas mesmas condições na presença de 1 mgL⁻¹ de IBA. As raízes apresentaram 1,0

cm quando permaneceram durante 10 ou 15 dias na presença de 1 ou 4 mgL⁻¹ de IBA (Figura18).

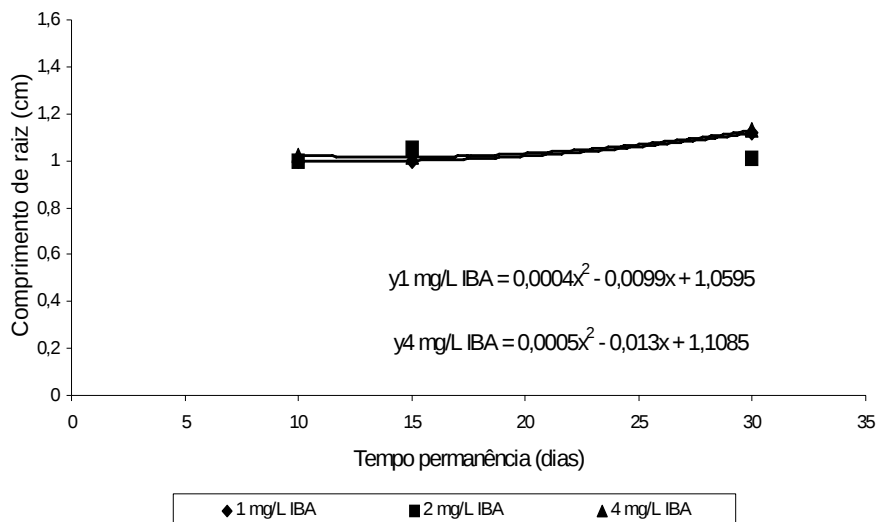


FIGURA 18: Comprimento de raiz (cm) de brotações de *Anemopaegma arvense* em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de IBA (mgL⁻¹), aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Em relação ao comprimento da parte aérea, os resultados foram diferentes. Maior comprimento de parte aérea (6 cm), foi obtido quando as brotações permaneceram durante todo o tempo, ou seja, 30 dias, na presença de 1 mgL⁻¹ de IBA. Nos outros tempos de permanência (10 e 15 dias), para esta mesma concentração, os resultados foram 5,5 e 6,3 cm, respectivamente. Na concentração de 4 mgL⁻¹ de IBA, a melhor resposta foi obtida no tempo de permanência de 10 dias (6,5 cm). Quando permaneceram por 15 ou 30 dias, as brotações apresentaram 5,5 cm (Figura 19).

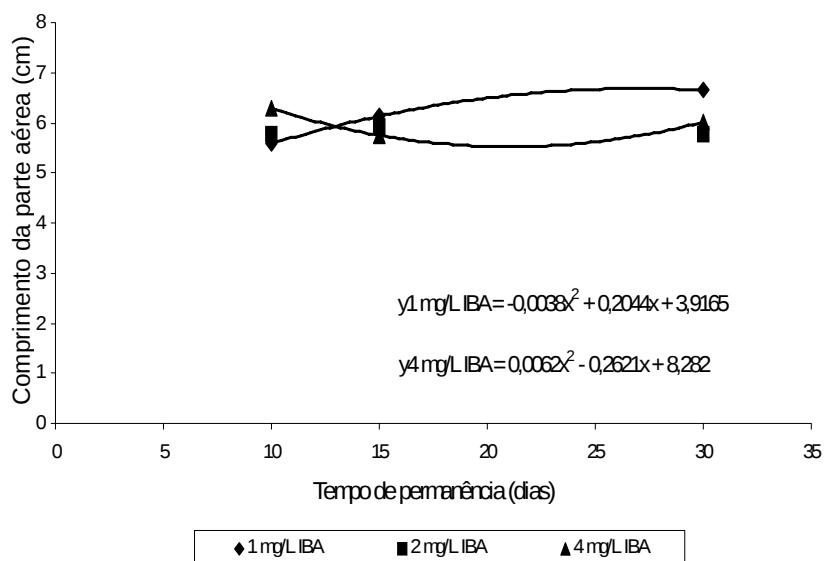


FIGURA 19: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de *Anemopaegma arvense* em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de IBA (mgL^{-1}), aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

De acordo com os resultados apresentados, nota-se que a melhor condição para se obter maior porcentagem de enraizamento, número e comprimento de raiz e comprimento da parte aérea adequado ao posterior processo de aclimatização das plântulas de *A. arvense*, também é a alternância das brotações do meio com auxina, para o meio isento deste regulador.

Assim como para a espécie *M. illustris*, os resultados obtidos com a *A. arvense*, também estão de acordo com numerosos trabalhos que relatam o tempo de duas ou três semanas de exposição das plântulas em auxina exógena, como o mais adequado ao enraizamento *in vitro* de inúmeras espécies (Souza, *et al.*, 2004; Bosa *et al.*, 2003; Negash *et al.*, 2000; Horváth, *et al.*, 2001; McCown, 1988; Majada *et al.*, 2000; Radmann, *et al.*, 2002; Nodoye *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2005; Joshee *et al.*, 2002; Manickam, *et al.*, 2000; Vengadesan, *et al.*, 2000).

Para que se obtenha o maior número de plântulas enraizadas, maior número e comprimento de raiz e um comprimento da parte aérea adequado, as brotações de *A. arvense*, devem permanecer durante 20 dias, na concentração de 2 mgL^{-1} de NAA.

Não observou-se a formação de calos na base nas plântulas de *A. arvense*, para nenhum dos tratamentos.

2) Efeito de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas

O principal hormônio relacionado à indução de raízes adventícias é a auxina. Entretanto, a ocorrência de outras substâncias endógenas, em associação ou não com as auxinas, têm sido apontadas, do mesmo modo, como benéficas ao processo de enraizamento *in vitro*. Alguns autores ressaltam que existe uma correlação entre o conteúdo endógeno de poliaminas e o desenvolvimento de raízes (Sankhla & Upadhyaya, 1988; Couée *et al.*, 2004).

Além da associação com atividades meristemáticas, a ação das poliaminas no desenvolvimento de raízes também pode estar relacionado à interação com fito-hormônios e interações bioquímicas inespecíficas em níveis moleculares com outras substâncias. Alguns estudos mostram que existe uma relação entre crescimento de raízes e conteúdo endógeno das diaminas putrescina e 1,3 diaminopropano e das poliaminas espermina e espermidina (Sankhla & Upadhyaya, 1988; Couée *et al.*, 2004).

De acordo com Arena *et al.*, (2005), a ação das poliaminas no processo de rizogênese, tem alcançado significativa relevância. No entanto, as poliaminas podem estimular ou inibir o enraizamento de plântulas dependendo do tipo e concentração empregada.

Neste contexto, como o principal objetivo deste trabalho é o estabelecimento de condições ótimas para o enraizamento *in vitro* das espécies *A. arvense*, *M. illustris* e *M. velutina*, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações e tipos de poliaminas.

Mandevilla illustris

Para a espécie *M. illustris*, as diaminas e as poliaminas não tiveram um efeito positivo significativo, pois a porcentagem de enraizamento foi relativamente baixa em todos os tratamentos. Aos 30 dias, maior porcentagem de enraizamento (16,7%), foi obtida

em meio MS. Quando as brotações foram inoculadas em meio MS/2, a maior porcentagem de enraizamento foi de 13,3% (Tabela 5).

TABELA 5: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla illustris* em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas em meio MS e MS/2, aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Efeito de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas em MS		Efeito de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas em MS/2	
TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO	TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO
0 - MS – controle	10 ± 1,808	0 – MS/2 – controle	0 ± 0
1 - MS + 1 mgL ⁻¹ de espermina	3,3 ± 1,347	1 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de espermina	0 ± 0
2 - MS + 5 mgL ⁻¹ de espermina	13,3 ± 1,704	2 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de espermina	0 ± 0
3 - MS + 10 mgL ⁻¹ de espermina	3,3 ± 1,347	3 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de espermina	13,3 ± 1,704
4 - MS + 1 mgL ⁻¹ de espermidina	10 ± 1,808	4 – MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de espermidina	3,3 ± 1,704
5 - MS + 5 mgL ⁻¹ de espermidina	10 ± 1,808	5 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de espermidina	13,3 ± 1,808
6 - MS + 10 mgL ⁻¹ de espermidina	10 ± 1,808	6 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de espermidina	10 ± 1,808
7 - MS + 1 mgL ⁻¹ de putrescina	6,7 ± 1,704	7 – MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de putrescina	0 ± 0
8 - MS + 5 mgL ⁻¹ de putrescina	13,3 ± 1,704	8 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de putrescina	13,3 ± 1,704
9 - MS + 10 mgL ⁻¹ de putrescina	3,3 ± 1,704	9 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de putrescina	10 ± 1,808
10 - MS + 1 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	16,7 ± 1,347	10 – MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	6,7 ± 1,704
11 - MS + 5 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	13,3 ± 1,704	11 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	6,7 ± 1,704
12 - MS + 10 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	3,3 ± 1,347	12 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	0 ± 0

No experimento realizado com meio MS, em todos os tratamentos realizados, houve a formação de raízes. Menor porcentagem de enraizamento foi de 3,3%, quando as brotações foram inoculadas em MS suplementado com 1 ou 10 mgL⁻¹ de espermina, 10 mgL⁻¹ de putrescina, ou 10 mgL⁻¹ de 1,3-diaminopropano. Maior porcentagem de

enraizamento (16,7%), foi obtida quando as brotações foram inoculadas em MS suplementado com 1 mgL^{-1} de 1,3-diaminopropano. Quando as brotações foram inoculadas em MS suplementado com 5 mgL^{-1} de espermina, ou 5 mgL^{-1} de putrescina e/ou 5 mgL^{-1} de 1,3-diaminopropano, 13,3% apresentaram raiz. Nos demais tratamentos, assim como no controle, a porcentagem de enraizamento foi de 10% (Tabela 5).

No experimento realizado com meio MS/2, alguns tratamentos apresentaram 0% de enraizamento: controle (MS/2), MS/2 suplementado com 1 ou 5 mgL^{-1} de espermina, 1 mgL^{-1} de putrescina e 10 mgL^{-1} de 1,3-diaminopropano. Maior porcentagem de enraizamento (13,3 %), foi obtida em MS/2 suplementado com 10 mgL^{-1} de espermina, 5 mgL^{-1} de espermidina e/ou putrescina. Quando as brotações foram cultivadas em MS/2 suplementado com 10 mgL^{-1} de espermidina e/ou putrescina, 10% enraizaram. Nos demais tratamentos, a porcentagem de enraizamento foi menor que 10% (Tabela 5).

No experimento realizado em meio MS, pelos resultados obtidos com a análise de variância, verificou-se que somente o comprimento da parte aérea apresentou diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$), para as diferentes diaminas e poliaminas testadas, assim como a interação diaminas e/ou poliaminas x concentração. Para as características número e comprimento de raiz, não houve diferença estatística significativa para nenhuma das variáveis analisadas.

No experimento realizado em meio MS/2, de acordo com os resultados obtidos com a análise de variância, verificou-se que o comprimento da parte aérea apresentou diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$), para as diaminas e poliaminas testadas, como também para a interação diamina e/ou poliaminas x concentração. Para a característica número de raiz, não houve diferença estatística significativa para nenhuma variável analisada. O comprimento das raízes apresentou diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$), somente para as diferentes concentrações testadas de diaminas e/ou poliaminas testadas.

Pelo teste de Scott-Knott ($\alpha < 5\%$), pode-se verificar que não houve diferença estatística significativa entre as diaminas e poliaminas testadas, para número e comprimento de raiz, mas somente para comprimento da parte aérea em meio MS e MS/2 aos 30 dias (Tabela 6).

TABELA 6: Valores médios das variáveis de resposta para número (NR) e comprimento de raiz (CR - cm) e comprimento da parte aérea (PA - cm) de brotações de *Mandevilla illustris* em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas, em meio MS e MS/2, aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

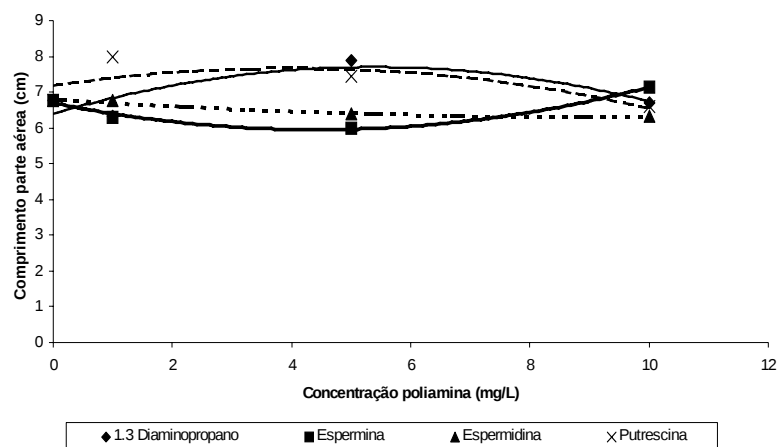
	MS	MS/2	MS	MS/2	MS	MS/2
TRATAMENTO	NR	NR	CR	CR	PA	PA
Controle	1,10 a ^z	1,00 a ^z	1,13 a	1,00 a	6,77 b	5,68 b
1,3 diaminopropano	1,14 a	1,03 a	1,09 a	1,02 a	6,97 a	5,76 b
Espermina	1,06 a	1,04 a	1,05 a	1,03 a	6,48 b	5,66 b
Espermidina	1,08 a	1,10 a	1,06 a	1,09 a	6,49 b	6,13 a
Putrescina	1,07 a	1,08 a	1,06 a	1,06 a	7,33 a	5,64 b

^z Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ($\alpha < 5\%$).

Maior média para comprimento da parte aérea (7,33 e 6,97 cm), foi obtido quando as brotações cresceram em meio MS suplementado com as diaminas putrescina e 1,3-diaminopropano, respectivamente. Em meio MS/2, maior média para comprimento da parte aérea (6,13 cm), foi obtido quando este foi suplementado com a poliamina espermina. Nos outros tratamentos, não houve diferença estatística e as médias variaram entre 5,64 e 5,76cm (Tabela 6).

O desdobramento do efeito de diferentes concentrações para cada tipo de diamina e poliamina em meio MS, sobre o comprimento da parte aérea de brotações de *M. illustris*, mostrou que houve diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$), em todos os tratamentos.

Aos 30 dias, menor comprimento da parte aérea (6 cm) foi observado quando as brotações foram cultivadas em meio contendo 5 mgL⁻¹ de espermina e 5 e 10 mgL⁻¹ de espermidina. Na concentração de 10 mgL⁻¹ de espermina, o comprimento da parte aérea foi de 7,5 cm. Para a diamina putrescina, observou-se que o comprimento da parte aérea foi menor com o aumento da concentração. Para a diamina 1,3-diaminopropano, à medida que aumentou a concentração de 1 mgL⁻¹ para 5 mgL⁻¹, a também aumentou, atingindo o máximo de 7,5 cm, na concentração de 10 mgL⁻¹ o comprimento da parte aérea foi 6,5 cm (Figura 20).



$$Y(1,3 \text{ diaminopropano}) = -0,045x^2 + 0,4841x + 6,3978 \quad R^2 = 0,6731$$

$$Y(\text{espermina}) = 0,0382x^2 - 0,3377x + 6,6986 \quad R^2 = 0,9783$$

$$Y(1,3 \text{ espermidina}) = 0,0057x^2 - 0,1068x + 6,8123 \quad R^2 = 0,9667$$

$$Y(\text{putrescina}) = -0,0307x^2 + 0,2443x + 7,1829 \quad R^2 = 0,5429$$

FIGURA 20: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de *Mandevilla illustris* em função da interação diaminas e/ou poliaminas x concentração, em meio MS, aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

O desdobramento do efeito de diferentes concentrações para cada tipo de diamina e poliamina em meio MS/2, sobre o comprimento da parte aérea de brotações de *M. illustris*, mostrou que os tratamentos com a diamina putrescina e a poliamina espermidina não apresentaram diferença estatística significativa, mas somente 1,3-diaminopropano e espermina ($\alpha < 5\%$).

Como discutido anteriormente, o comprimento de raiz de brotações de *M. illustris*, foi influenciado pelas diferentes concentrações testadas, independente do tipo de diamina e/ou poliamina. O comprimento das raízes aumentou à medida que se aumentou a concentração, até o ponto ótimo de $8,6 \text{ mgL}^{-1}$, onde obteve-se maior comprimento (1,06 cm) (Figura 21).

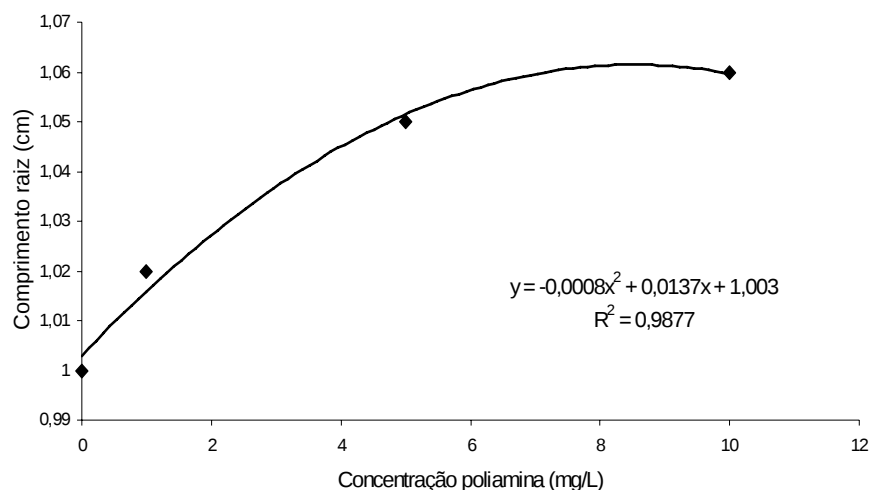


FIGURA 21: Comprimento da raiz (cm) de brotações de *Mandevilla illustris* em função de diferentes concentrações de diaminas poliaminas, em meio MS/2, aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Pela Figura 22, observa-se que para a poliamina espermina, o comprimento da parte aérea aumentou até a concentração ótima de 5 mgL^{-1} , onde maior média foi obtida (6,2 cm). A partir deste ponto, o crescimento foi menor. Nas concentrações de 1 e 10 mgL^{-1} de espermina e 10 mgL^{-1} de 1,3-diaminopropano, o comprimento da parte aérea foi de 6 cm. Menor comprimento da parte aérea ($5,5 \text{ cm}$), foi obtido na concentração de 5 mgL^{-1} de 1,3-diaminopropano.

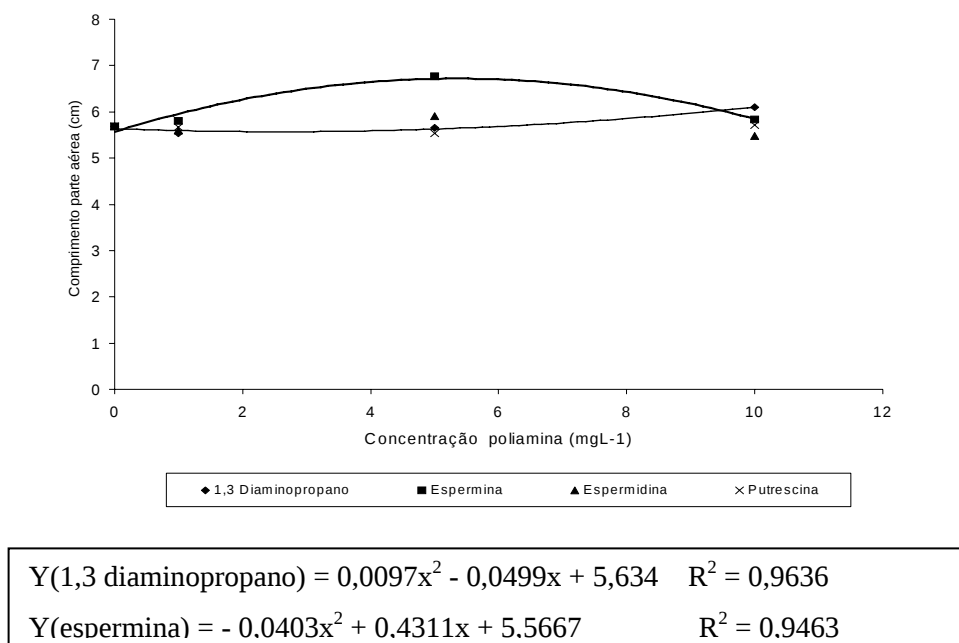


FIGURA 22: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de *Mandevilla illustris* em função da interação diaminas e/ou poliaminas x concentração, em meio MS/2, aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Mandevilla velutina

Nos experimentos realizados com *M. velutina*, assim como para a espécie *M. illustris*, as diaminas e as poliaminas não possibilitaram o enraizamento *in vitro* satisfatório das brotações. Tanto no meio MS quanto em meio MS/2, a porcentagem de enraizamento foi menor que 10% (Tabelas 7 e 8).

Esses resultados mostram a importância da relação genótipo x regulador vegetal empregado nos estudos de enraizamento *in vitro*. Os experimentos realizados com auxinas, embora tenham induzido diferentes respostas nas espécies *M. illustris* e *M. velutina*, possibilitaram a obtenção de melhores resultados quando comparados a ação de diaminas e poliaminas. Desse modo, percebe-se a influência direta do genótipo, mas também a importância da relação entre estes dois fatores.

TABELA 7: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla velutina* em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas em meio MS e MS/2, aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Efeito de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas em MS		Efeito de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas em MS/2	
TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO	TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO
0 - MS – controle	0 ± 0	0 – MS/2 – controle	0 ± 0
1 - MS + 1 mgL ⁻¹ de espermina	0 ± 0	1 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de espermina	0 ± 0
2 - MS + 5 mgL ⁻¹ de espermina	0 ± 0	2 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de espermina	$3,3 \pm 1,347$
3 - MS + 10 mgL ⁻¹ de espermina	$3,3 \pm 1,347$	3 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de espermina	0 ± 0
4 - MS + 1 mgL ⁻¹ de espermidina	0 ± 0	4 – MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de espermidina	$3,3 \pm 1,347$
5 - MS + 5 mgL ⁻¹ de espermidina	0 ± 0	5 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de espermidina	$3,3 \pm 1,347$
6 - MS + 10 mgL ⁻¹ de espermidina	0 ± 0	6 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de espermidina	0 ± 0
7 - MS + 1 mgL ⁻¹ de putrescina	$3,3 \pm 1,347$	7 – MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de putrescina	$3,3 \pm 1,347$
8 - MS + 5 mgL ⁻¹ de putrescina	$3,3 \pm 1,347$	8 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de putrescina	$3,3 \pm 1,347$
9 - MS + 10 mgL ⁻¹ de putrescina	0 ± 0	9 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de putrescina	0 ± 0
10 - MS + 1 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	0 ± 0	10 – MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	$3,3 \pm 1,347$
11 - MS + 5 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	0 ± 0	11 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	$3,3 \pm 1,347$
12 - MS + 10 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	$3,3 \pm 1,347$	12 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	0 ± 0

TABELA 8: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla velutina* em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas em meio MS e MS/2, aos 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Efeito de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas em MS		Efeito de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas em MS/2	
TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO	TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO
0 - MS – controle	3,3 ± 1,347	0 – MS/2 – controle	0 ± 0
1 - MS + 1 mgL ⁻¹ de espermina	0 ± 0	1 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de espermina	0 ± 0
2 - MS + 5 mgL ⁻¹ de espermina	0 ± 0	2 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de espermina	3,3 ± 1,347
3 - MS + 10 mgL ⁻¹ de espermina	3,3 ± 1,347	3 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de espermina	0 ± 0
4 - MS + 1 mgL ⁻¹ de espermidina	0 ± 0	4 – MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de espermidina	3,3 ± 1,347
5 - MS + 5 mgL ⁻¹ de espermidina	0 ± 0	5 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de espermidina	3,3 ± 1,347
6 - MS + 10 mgL ⁻¹ de espermidina	6,7 ± 1,704	6 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de espermidina	0 ± 0
7 - MS + 1 mgL ⁻¹ de putrescina	0 ± 1,347	7 – MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de putrescina	6,7 ± 1,704
8 - MS + 5 mgL ⁻¹ de putrescina	6,7 ± 1,704	8 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de putrescina	3,3 ± 1,347
9 - MS + 10 mgL ⁻¹ de putrescina	0 ± 0	9 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de putrescina	6,7 ± 1,704
10 - MS + 1 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	0 ± 0	10 – MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	6,7 ± 1,704
11 - MS + 5 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	0 ± 0	11 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	3,3 ± 1,347
12 - MS + 10 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	3,3 ± 1,347	12 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	0 ± 0

Aos 30 dias, apenas 3% de brotações apresentaram raiz quando inoculadas em meio MS suplementado com 1 mgL⁻¹ de putrescina e/ou 10 mgL⁻¹ de espermina e 1,3-diaminopropano. Em todos os outros tratamentos, nenhuma brotação apresentou raiz (Tabela 7).

Para o experimento realizado em meio MS/2, os resultados foram semelhantes. Do mesmo modo, aos 30 dias, apenas 3% das brotações apresentaram raiz quando inoculadas em MS/2 suplementado com 1 mgL⁻¹ de espermidina, putrescina e 1,3-

diaminopropano, 5 mgL⁻¹ de espermina, espermidina e 1,3-diaminopropano. Nenhuma brotação apresentou raiz nos demais tratamentos (Tabela 7).

Aos 60 dias, 6,7% das brotações apresentaram raiz quando inoculadas em MS suplementado com 5 mgL⁻¹ de putrescina e 10 mgL⁻¹ de espermidina. Nos outros tratamentos, os resultados permaneceram iguais aos obtidos na avaliação realizada aos 30 dias. Para o experimento realizado em meio MS/2, aos 60 dias, 6,7% das brotações apresentaram raiz quando inoculadas em MS/2 suplementado com 1 e/ou 10 mgL⁻¹ de putrescina e 1 mgL⁻¹ de 1,3-diaminopropano. Quando as brotações foram inoculadas em MS/2 suplementado com 1 e/ou 5 mgL⁻¹ de espermidina, 5 mgL⁻¹ de espermina, putrescina e 1,3-diaminopropano, 3% das plântulas apresentaram raiz. Nos outros tratamentos, nenhuma brotação enraizou (Tabela 8).

No experimento realizado em meio MS, pelos resultados obtidos na análise de variância na avaliação realizada aos 30 dias, verificou-se que somente o comprimento da parte aérea apresentou diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$), na interação diaminas e/ou poliaminas x concentração. Tanto o número quanto o comprimento de raiz, não foram influenciados pelas diferentes concentrações e tipos de diaminas e/ou poliaminas testadas.

Quando as brotações de *M. velutina* foram inoculadas em meio MS/2, os resultados foram semelhantes ao meio MS para número e comprimento de raiz, visto que não houve diferença estatística significativa entre as diferentes concentrações das diferentes diaminas e/ou poliaminas testadas, aos 30 dias de avaliação. No entanto, os resultados para comprimento da parte aérea foram diferentes do meio MS, visto que em meio MS/2 esta característica também não apresentou diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$), entre os tratamentos.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9, pode-se verificar que não houve diferença estatística significativa pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade para nenhuma das características avaliadas em meio MS e MS/2, aos 30 dias de avaliação. No entanto, mesmo não ocorrendo diferença estatística significativa entre os tratamentos para comprimento da parte aérea em meio MS/2, observou-se que as médias foram maiores quando comparadas ao meio MS.

TABELA 9: Valores médios das variáveis de resposta para número (NR) e comprimento de raiz (CR - cm) e comprimento da parte aérea (PA - cm) de brotações de *Mandevilla velutina* em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas, em meio MS e MS/2, aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

	MS	MS/2	MS	MS/2	MS	MS/2
TRATAMENTO	NR	NR	CR	CR	PA	PA
Controle	1,00 a ^z	1,00 a	1,00 a	1,00 a	6,62 a	7,69 a
1,3 diaminopropano	1,01 a	1,02 a	1,00 a	1,02 a	6,83 a	7,63 a
Espermina	1,01 a	1,01 a	1,01 a	1,00 a	6,49 a	7,29 a
Espermidina	1,00 a	1,02 a	1,00 a	1,02 a	6,72 a	7,14 a
Putrescina	1,01 a	1,01 a	1,01 a	1,01 a	6,86 a	7,85 a

^z Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

O desdobramento do efeito de diferentes concentrações para cada tipo de diamina e/ou poliamina em meio MS, sobre o comprimento da parte aérea de brotações de *M. velutina* aos 30 dias, mostrou que somente as diferentes concentrações da poliamina espermina e da diamina putrescina apresentaram diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$).

Maior média para comprimento da parte aérea (7 cm), aos 30 dias, foi obtida quando o meio MS foi suplementado com 5 mgL⁻¹ de putrescina. Quando a concentração foi aumentada para 10 mgL⁻¹, o comprimento da parte aérea foi de 6 cm. Quando testou-se diferentes concentrações de espermina, o comprimento da parte aérea aumentou a medida que se aumentou a concentração da poliamina, atingindo 7 cm aproximadamente na concentração de 10 mgL⁻¹. No entanto, para esta poliamina, maiores concentrações devem ser testadas para que se estabeleça o ponto ótimo entre concentração de espermina x comprimento da parte aérea (Figura 23).

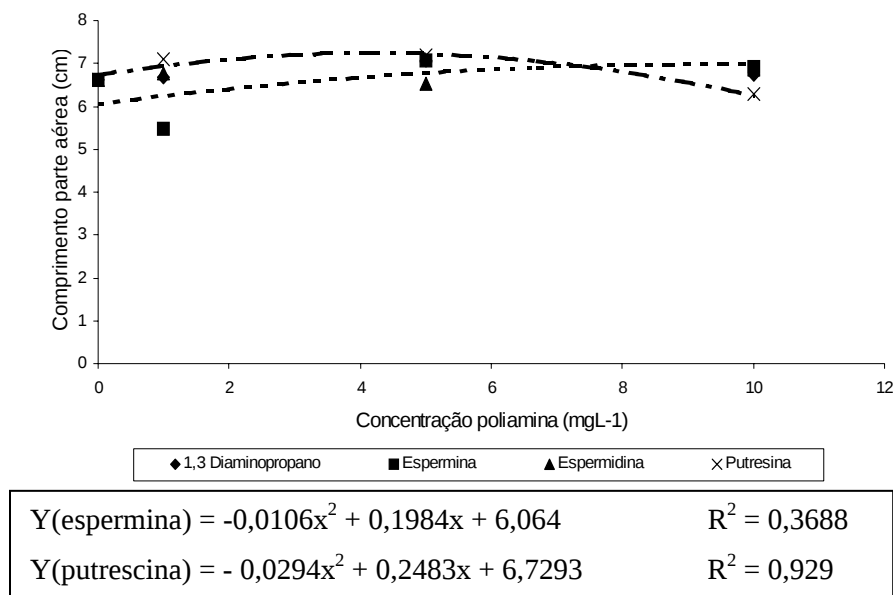


FIGURA 23: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de *Mandevilla velutina* em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas, em meio MS, aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Em meio MS, na avaliação realizada aos 60 dias, assim como aos 30 dias, verificou-se através da análise de variância, que tanto o número quanto o comprimento de raiz das brotações de *M. velutina* não foram influenciados significativamente pelas concentrações das diferentes diaminas e poliaminas testadas. Entretanto, o comprimento da parte aérea, apresentou diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$), para todas as variáveis analisadas.

No experimento realizado em meio MS/2, os resultados obtidos na avaliação realizada aos 60 dias através da análise de variância, mostraram que, assim como aos 30 dias, nenhuma das características avaliadas apresentaram diferença estatística significativa entre as concentrações das diferentes diaminas e poliaminas testadas.

Os resultados obtidos pelo teste de Scott-Knott ($\alpha < 5\%$), mostraram que aos 60 dias em meio MS, não houve diferença estatística significativa para número e comprimento de raiz, mas somente para comprimento da parte aérea. Em meio MS/2 não

houve diferença estatística significativa para nenhuma das características avaliadas (Tabela 10).

TABELA 10: Valores médios das variáveis de resposta para número (NR) e comprimento de raiz (CR - cm) e comprimento da parte aérea (PA - cm) de brotações de *Mandevilla velutina* em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas, em meio MS e MS/2, aos 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

	MS	MS/2	MS	MS/2	MS	MS/2
TRATAMENTO	NR	NR	CR	CR	PA	PA
Controle	1,03 a ^z	1,00 a	1,02 a	1,00 a	8,88 a	9,23 a
1,3 diaminopropano	1,01 a	1,02 a	1,00 a	1,03 a	6,72 b	8,89 a
Espermina	1,01 a	1,01 a	1,01 a	1,01 a	6,13 b	8,64 a
Espermidina	1,01 a	1,03 a	1,01 a	1,02 a	7,46 b	8,66 a
Putrescina	1,01 a	1,04 a	1,02 a	1,02 a	8,18 a	8,28 a

^z Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

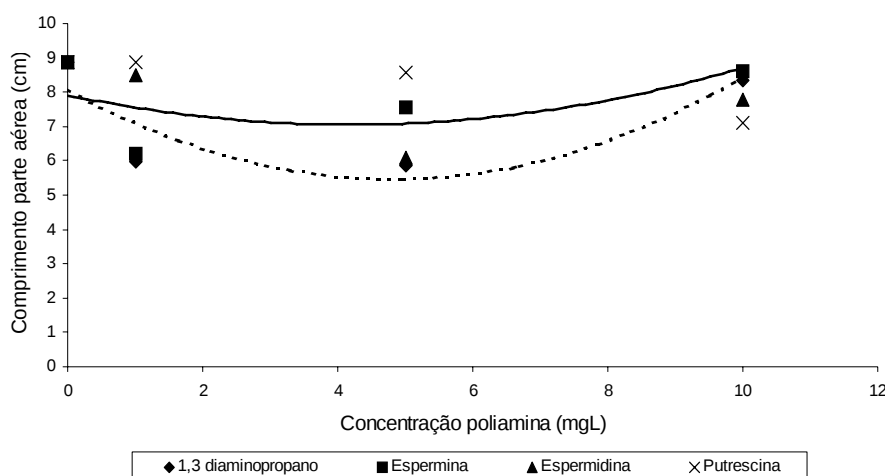
Assim como aos 30 dias de avaliação, os resultados obtidos aos 60 dias, pelo teste de Scott-Knott ($\alpha < 5\%$), mostraram que, mesmo não ocorrendo diferença estatística significativa entre os tratamentos para comprimento da parte aérea em meio MS/2, as médias foram maiores quando comparadas ao meio MS (Tabela 10).

Em meio MS, aos 60 dias, maior média para comprimento da parte aérea (8,88 cm), foi obtida no tratamento controle. Quando o meio MS foi suplementado com a diamina putrescina, a média não diferiu estatisticamente do controle e foi de 8,18 cm. Menor média (6,13 cm), foi obtida com a poliamina espermina (Tabela 10).

O desdobramento do efeito de diferentes concentrações para cada tipo de diamina e/ou poliamina em meio MS, sobre o comprimento da parte aérea de brotações de *M. velutina* aos 60 dias, mostrou que somente as concentrações da poliamina espermina e da diamina 1,3-diaminopropano, apresentaram diferença estatística significativa.

Menor comprimento da parte aérea (5,5 cm) foi obtido na concentração de 1 mgL⁻¹ de espermina. Nas concentrações 5 e 10 mgL⁻¹ de espermina, os

resultados foram 6,5 cm. Para a diamina 1,3-diaminopropano, os resultados foram 6,5 cm em 1 mgL^{-1} e em 5 mgL^{-1} e 6,2 cm em 10 mgL^{-1} (Figura 24).



$$Y(1,3 \text{ diaminopropano}) = 0,1112x^2 - 1,0766x + 8,066$$

$$R^2 = 0,7129$$

$$Y(\text{espermina}) = 0,0486x^2 - 0,4101x + 7,9135$$

$$R^2 = 0,3204$$

FIGURA 24: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de *M. velutina* em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas, em meio MS, aos 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Anemopaegma arvense

No experimento realizado com a espécie *A. arvense*, as diaminas e as poliaminas, possibilitaram a obtenção de resultados consideráveis, quando comparado à *M. velutina* e *M. illustris*, tanto para porcentagem de enraizamento, quanto para as outras características avaliadas, mostrando novamente a importância de se considerar a influência do genótipo nos estudos de enraizamento *in vitro*.

Na avaliação realizada aos 30 dias, todos os tratamentos apresentaram brotações com raízes. Menor porcentagem de enraizamento (3,3%) foi obtido quando as brotações foram inoculadas em meio MS/2 suplementado com 5 mgL^{-1} de espermina e/ou espermidina e 10 mgL^{-1} de espermina e/ou espermidina. Maior porcentagem de enraizamento

(27%) foi obtido em MS/2 suplementado com 5 mgL⁻¹ de putrescina. 16,7% das brotações apresentaram raiz quando foram inoculadas em MS/2 suplementado com 1 mgL⁻¹ de espermina, espermidina e 1,3-diaminopropano e 10 mgL⁻¹ de 1,3-diaminopropano. Nos demais tratamentos, assim como no controle, a porcentagem de enraizamento foi menor ou igual a 10% (Tabela 11).

TABELA 11: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Anemopaegma arvense* em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas em meio MS/2, aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Efeito de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas em MS/2	
TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO
0 – MS/2 – controle	13,3 ± 1,704
1 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de espermina	16,7 ± 2,529
2 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de espermina	3,3 ± 1,438
3 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de espermina	3,3 ± 1,347
4 – MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de espermidina	16,7 ± 2,515
5 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de espermidina	3,3 ± 1,347
6 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de espermidina	3,3 ± 1,347
7 – MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de putrescina	10 ± 1,808
8 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de putrescina	26,7 ± 4,548
9 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de putrescina	10 ± 2,797
10 – MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminopropano	16,7 ± 3,895
11 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminopropano	10 ± 1,808
12 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminopropano	16,7 ± 2,515

Os resultados obtidos na análise de variância, na avaliação realizada aos 30 dias, mostraram que não houve diferença estatística significativa entre as diferentes concentrações das diferentes diaminas e poliaminas testadas, assim como na interação diaminas e/ou poliaminas x concentração, para nenhuma das características avaliadas.

Pela Tabela 12, pode-se verificar que não houve diferença estatística significativa pelo teste de Scott-Knott ($\alpha < 5\%$), para nenhuma das características avaliadas aos 30 dias. No entanto, mesmo não havendo diferença estatística no comprimento da parte aérea entre as diferentes diaminas e poliaminas testadas, assim como foi constatado para a espécie

M. velutina, maior média para comprimento da parte aérea de brotações de *A. arvense* (5,72) também foi obtida no controle, ou seja, meio MS/2.

TABELA 12: Valores médios das variáveis de resposta para número (NR) e comprimento de raiz (CR - cm) e comprimento da parte aérea (PA - cm) de brotações de *Anemopaegma arvense* em função de diferentes concentrações e tipos de diaminas e poliaminas, em meio MS/2, aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

TRATAMENTO	NR	CR	PA
Controle	1,11 a ^z	1,10 a	5,72 a
1,3 diaminopropano	1,10 a	1,13 a	5,59 a
Espermina	1,06 a	1,08 a	5,59 a
Espermidina	1,06 a	1,07 a	5,24 a
Putrescina	1,11 a	1,09 a	5,57 a

^z Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Vários estudos têm mostrado que ocorre um decréscimo nos níveis endógenos de diaminas e/ou poliaminas com a inibição do crescimento das raízes e um acúmulo durante o crescimento dos tecidos e a organogênese (Sankhla & Upadhyaya, 1988; Couée *et al.*, 2004; Tang & Newton, 2005).

No entanto, as respostas quanto ao efeito positivo ou negativo destas substâncias, sobre a indução de raízes é significativamente variável entre as espécies (Tang & Newton, 2004; Couée *et al.*, 2004).

Mesmo que alguns estudos tenham mostrado que as diaminas e as poliaminas estejam presentes nos tecidos de raízes, favorecendo o enraizamento, os resultados ainda são incipientes, para que se possa afirmar de forma indubitável que estas substâncias estejam envolvidas neste processo. Todavia, estas substâncias têm sido usualmente citadas como marcadores bioquímicos durante as análises das fases de enraizamento, devido à correlação com as mudanças morfológicas dos tecidos.

Desse modo, é necessário a realização de estudos bioquímicos, para se verificar a presença de diaminas e poliaminas nos tecidos radiculares e o seu efeito sobre a indução de raízes adventícias, especificamente, para cada espécie em estudo.

Quando Neves *et al.*, (2002), estudaram o envolvimento de diaminas e poliaminas livres e conjugadas no enraizamento adventício de brotos e plântulas micropropagadas de *Vitis vinifera*, consideraram a diamina putrescina como um marcador bioquímico na indução de raízes *in vitro*. A indução do acúmulo de putrescina, através de um inibidor da espermidina sintase a ciclohexalamina, induziu o aumento do enraizamento desta espécie.

Pastur *et al.*, (2005), comprovou por meio de cortes histológicos, que a presença de poliaminas, além de outras substâncias, podem ser usados como marcadores bioquímicos durante as fases de enraizamento *in vitro* de *Nothofagus nervosa*.

Mudanças nos níveis endógenos da diamina putrescina e das poliaminas espermidina e espermina, evolução da atividade de peroxidase e desenvolvimento morfológico, foi estudado por Arena *et al.*, (2003), com o objetivo de caracterizar o processo de rizogênese *in vitro* de brotos de *B. buxifolia*, definindo as fases de enraizamento. Os autores observaram mudanças significativas nos níveis da diamina e das poliaminas e peroxidase, durante o período de enraizamento, onde baixa concentração da diamina e das poliaminas e alta atividade de peroxidase, foi observada durante os primeiros quatro dias do processo. Quando estes compostos foram usados para definir as fases de enraizamento, observou-se que a fase de indução ocorre de 0 a 4-7 dias, e a fase de expressão, de 4-7 a 28 dias, aproximadamente. Durante essas fases, os autores observaram que mudanças nos níveis dos marcadores bioquímicos podem ser correlatados com observações macro e microscópicas nos tecidos dos brotos.

Quando Tang & Newton (2004), estudaram a relação de diaminas e poliaminas e polifenoloxidades no crescimento de tecidos de *Pinus virginiana*, observaram que o crescimento de calos, a diferenciação de brotos e brotos enraizados, foram inibidos quando houve uma associação entre acúmulo de polifenoloxidades e decréscimo de putrescina, espermidina ou espermina.

Vários trabalhos mostrando o envolvimento das poliaminas aplicadas exogenamente no desenvolvimento de raízes adventícias em plantas são mencionados por Couée *et al.*, (2004). Resultados positivos foram obtidos com tabaco, feijão, uva e *Arabidopsis thaliana*. Nesse caso, tem sido visto que o balanço total de diferentes poliaminas pode ser mais importante do que cada poliamina especificamente.

A ação das poliaminas na divisão de células apicais radiculares e a toxicidade no desenvolvimento de raízes, causada por altas concentrações dessas substâncias, foi demonstrada por Tang & Newton (2005), quando estudaram a influência da aplicação exógena de poliaminas no desenvolvimento de raízes adventícias de *Pinus virginiana*. As poliaminas putrescina, espermidina e espermina na concentração de 0.001mM aumentaram a frequência de enraizamento e promoveram a elongação das raízes. Concentrações variando entre 0.01 –1mM, foram tóxicas. Os estudos demonstraram que a ação das poliaminas foi na atividade mitótica das células apicais das raízes, acarretando na formação e elongação.

Arena *et al.*, (2005), comprovou a ação das poliaminas sobre o enraizamento *in vitro* de *Berberis buxifolia*, com o uso de inibidores de poliaminas. Quando o meio de cultura continha somente inibidores e/ou inibidores e poliaminas, nenhum ou poucos brotos apresentaram raízes, respectivamente. Os melhores resultados foram obtidos quando 1mM de espermidina foi adicionada ao meio de cultura, na ausência de inibidores, durante a fase de formação e elongação das raízes. As poliaminas proporcionaram um aumento na qualidade e quantidade das raízes para esta espécie.

Nos estudos realizados com a espécie *Vigna radiata*, Sankhla & Upadhyaya (1988), obtiveram resultados negativos na presença das poliaminas espermina e espermidina e da diamina putrescina, como também para os precursores das poliaminas (α -arginina e α -ornitina) e seus análogos (α -canavanina e α -canalina).

Comparando os dados apresentados neste trabalho para as espécies *A. arvense*, *M. velutina* e *M. illustris*, com os mencionados anteriormente, nota-se a necessidade da realização de novos experimentos, onde seria interessante testar concentrações menores, bem como as diaminas e poliaminas conjugadas num mesmo tratamento, para se avaliar a ação dessas substâncias quando em conjunto e em menores concentrações e comparar com os dados já obtidos.

No entanto, sugerimos que no futuro seja realizado estudos bioquímicos, para estas espécies, nas diferentes fases de enraizamento, que evidenciem ou não a presença de poliaminas nos tecidos radiculares e o seu envolvimento na indução de raízes adventícias.

3) Efeito de auxina e poliaminas

As poliaminas associadas ou não com as auxinas tem mostrado um efeito positivo considerável na indução de raízes adventícias em plântulas de várias espécies cultivadas *in vitro* (Sankhla & Upadhyaya, 1988; Couée *et al.*, 2004)

De acordo com Neves *et al.*, (2002), o processo de diferenciação dos tecidos, como a formação de raízes adventícias, depende de fatores endógenos, entre os quais, as auxinas e poliaminas, são citadas por desempenharem importante papel.

Após a seleção da melhor auxina e melhor diamina ou poliamina nos experimentos realizados anteriormente, realizou-se este experimento com as espécies *M. illustris* e *M. velutina*, associando ambos os compostos.

Tendo em vista os resultados obtidos nas avaliações realizadas no experimento com auxinas para as espécies *M. illustris* e *M. velutina*, a auxina NAA, na concentração de 1 mgL⁻¹ foi selecionada como a mais adequada para condução deste experimento, em associação com poliaminas.

O enraizamento de *M. illustris* e *M. velutina* não foi influenciado significativamente pelas diferentes diaminas e/ou poliaminas testadas no experimento anterior. No entanto, houve diferença para comprimento da parte aérea para as duas espécies.

Como o comprimento da parte aérea é um dos fatores que podem auxiliar no desenvolvimento de raízes adventícias *in vitro*, por ser fonte de substâncias necessárias e favoráveis ao enraizamento, selecionou-se portanto, a poliamina que promoveu um comprimento adequado da parte aérea para as duas espécies, para a condução deste experimento.

Os resultados obtidos na avaliação realizada aos 30 dias, para a espécie *M. illustris*, mostraram que os valores médios para a característica comprimento da parte aérea, diferiram estatisticamente entre as concentrações e as diaminas e poliaminas testadas e foram maiores no meio MS, do que no meio MS/2.

Todavia, considerando o fato de meios menos concentrados serem mais adequados para a condução de experimentos de enraizamento *in vitro*, e como no experimento com auxinas, o meio MS/2 possibilitou a obtenção de resultados satisfatórios

para a espécie *M. illustris*, optou-se por selecionar a diamina ou poliamina que promoveu melhor crescimento da parte aérea, no experimento realizado com meio MS/2.

O melhor resultado para o comprimento da parte aérea, foi obtido quando o meio MS/2 foi suplementado com a poliamina espermidina. Sendo assim, para a espécie *M. illustris* selecionou-se esta como a mais adequada, para a condução deste experimento, em associação com 1 mgL^{-1} de NAA.

Para a espécie *M. velutina*, os resultados foram diferentes. Os maiores valores médios para a característica comprimento da parte aérea, foram obtidos em meio MS/2. Mas também não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, nas avaliações realizadas aos 30 e 60 dias. Contudo, optou-se por selecionar a diamina putrescina, devido a obtenção do maior valor médio para esta característica.

Mandevilla illustris

Para a espécie *M. illustris*, observou-se que a associação das duas substâncias, não possibilitou a obtenção de resultados satisfatórios na formação de raízes *in vitro*, nas duas datas de avaliação, quando comparados ao experimento 1, quando as brotações foram cultivadas somente na presença de auxinas.

No entanto, os resultados obtidos neste experimento, mostraram que a associação das duas substâncias foi mais eficiente quando comparado aos resultados obtidos quando utilizou-se somente as diaminas e poliaminas, porque a porcentagem das brotações enraizadas foi maior.

Aos 30 dias, maior porcentagem de enraizamento (33%), ocorreu quando 1 mgL^{-1} de NAA foi associado a 5 mgL^{-1} de espermidina, seguido de 30% quando associado a 1 mgL^{-1} de espermidina. Quando associou-se a auxina com a maior concentração de espermidina, ou seja, 10 mgL^{-1} , obteve-se a menor porcentagem de enraizamento (23%). Quando as brotações foram inoculadas somente na presença de 1 mgL^{-1} de NAA, 27% enraizaram. Aos 60 dias de avaliação, os resultados foram diferentes. Maior porcentagem de enraizamento (50%) ocorreu somente na presença da auxina. Quando a auxina foi associada com as diaminas ou poliaminas, a maior porcentagem de enraizamento (43%), ocorreu na

menor concentração de espermidina, ou seja 1 mgL⁻¹, seguido de 40% em 5 mgL⁻¹ e 20% em 10 mgL⁻¹ (Tabela 13).

TABELA 13: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla illustris* em função de diferentes concentrações de espermidina, associada a 1 mgL⁻¹ de NAA, aos 30 e 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Efeito de auxina e poliamina		
TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO (30 dias)	% ENRAIZAMENTO (60 dias)
0 – controle - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA	26,7 ± 1,756	50 ± 4,091
1- MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA + 1 mgL ⁻¹ de espermidina	30 ± 2,809	43,3 ± 2,515
2- MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA + 5 mgL ⁻¹ de espermidina	33,3 ± 3,454	40 ± 4,222
3 – MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA + 10 mgL ⁻¹ de espermidina	23,3 ± 1,388	20 ± 2,996

A maior concentração de espermidina, promoveu a menor porcentagem de enraizamento nos dois tempos de avaliação. Isso mostra que as concentrações utilizadas podem estar próximas do nível de toxicidade como foi mostrado nos trabalhos relatados por Sankhla & Upadhyaya (1988), para a espécie *Vigna radiata*.

Pelos resultados da análise de variância, na avaliação realizada ao 30 dias, verificou-se que o número e comprimento de raiz e o comprimento da parte aérea, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos. Aos 60 dias de avaliação, os resultados foram diferentes. Houve diferença estatística significativa ($\alpha < 1\%$), entre os tratamentos, para a característica número de raiz.

Os resultados obtidos através do teste de Scott-Knott ($\alpha < 5\%$), mostraram que aos 30 dias, não houve diferença estatística significativa para nenhuma das características avaliadas. Aos 60 dias, não houve diferença estatística significativa para comprimento de raiz e parte aérea, mas somente para número de raiz (Tabela 14).

TABELA 14: Valores médios das variáveis de resposta para número (NR) e comprimento de raiz (CR - cm) e comprimento da parte aérea (PA - cm) de brotações de *Mandevilla illustris* em função de diferentes concentrações de espermidina, associada a 1 mgL⁻¹ de NAA, aos 30 e 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

TRATAMENTO	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
	NR	NR	CR	CR	PA	PA
0 – controle - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA	0,96 a ^z	1,09 a	0,82 a	0,93 a	6,83 a	8,47 a
1- MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA + 1 mgL ⁻¹ de espermidina	1,00 a	1,23 a	0,85 a	1,00 a	6,58 a	8,25 a
2- MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA + 5 mgL ⁻¹ de espermidina	1,07 a	1,18 a	0,97 a	1,00 a	7,10 a	8,80 a
3 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA + 10 mgL ⁻¹ de espermidina	0,86 a	0,83 b	0,77 a	0,78 a	7,02 a	9,43 a

^z Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Maiores médias para número de raiz (1,23 e 1,18) foram obtidas nos tratamentos em que a 1 mgL⁻¹ de NAA foi associado a 1 e 5 mgL⁻¹ de espermidina, respectivamente. Entretanto, o controle (1 mgL⁻¹ de NAA), não diferiu estatisticamente destes tratamentos, onde a média para número de raiz foi de 1,09. Menor média foi obtida quando 1 mgL⁻¹ de NAA foi associado a 10 mgL⁻¹ de espermidina.

Mandevilla velutina

Para a espécie *M. velutina*, a associação de diferentes concentrações de putrescina a 1 mgL⁻¹ de NAA também não foi eficiente para promover o enraizamento *in vitro*, porque os resultados foram os mesmos daqueles obtidos nos experimentos realizados anteriormente. Aos 30 dias de avaliação, maior porcentagem de enraizamento (6,7%), ocorreu somente na presença da auxina. Quando as brotações foram inoculadas na presença da diamina, a porcentagem de enraizamento foi de 3,3% para todas as concentrações. Aos 60 dias, 10% das brotações apresentaram raiz quando inoculadas na auxina associada com 1 ou 5

mgL⁻¹ de putrescina. Menor porcentagem de enraizamento (6,7%), ocorreu quando as brotações foram inoculadas somente na presença de auxina, e/ou quando a auxina foi associada com 10 mgL⁻¹ de putrescina (Tabela 15).

Assim como ocorreu com a *M. illustris*, a maior concentração da diamina também promoveu menor porcentagem de enraizamento em plantas de *M. velutina*, nos dois tempos de avaliação.

TABELA 15: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla velutina* em função de diferentes concentrações de putrescina associada a 1 mgL⁻¹ de NAA, aos 30 e 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

TRATAMENTO	Efeito de auxina e diamina	
	% ENRAIZAMENTO (30 dias)	% ENRAIZAMENTO (60 dias)
0 – controle - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA	6,7 ± 2,735	6,7 ± 2,735
1- MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA + 1 mgL ⁻¹ de putrescina	3,3 ± 1,347	10 ± 2,848
2- MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA + 5 mgL ⁻¹ de putrescina	3,3 ± 1,347	10 ± 1,808
3 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA + 10 mgL ⁻¹ de putrescina	3,3 ± 1,347	6,7 ± 1,704

Pelos resultados da análise de variância, obtidos nas avaliações realizadas aos 30 e 60 dias, verificou-se que o número e comprimento de raiz e comprimento da parte aérea, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos.

Os resultados obtidos através do teste de Scott-Knott ($\alpha < 5\%$), mostraram que aos 30 dias, não houve diferença estatística significativa para número e comprimento de raiz, mas somente para comprimento da parte aérea. Aos 60 dias, os resultados foram diferentes e não houve diferença estatística significativa para nenhuma das características avaliadas (Tabela 16).

TABELA 16: Valores médios das variáveis de resposta para número (NR) e comprimento de raiz (CR - cm) e comprimento da parte aérea (PA - cm) de brotações de *Mandevilla velutina* em função de diferentes concentrações de putrescina, associada a 1 mgL⁻¹ de NAA, aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
TRATAMENTO	NR	NR	CR	CR	PA	PA
0 – controle - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA	0,76 a ^z	0,78 a	0,75 a	0,82 a	6,77 b	9,25 a
1- MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA + 1 mgL ⁻¹ de putrescina	0,73 a	0,77 a	0,73 a	0,77 a	7,13 b	9,52 a
2- MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA + 5 mgL ⁻¹ de putrescina	0,75 a	0,84 a	0,73 a	0,85 a	8,30 a	9,90 a
3 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA + 10 mgL ⁻¹ de putrescina	0,73 a	0,77 a	0,72 a	0,76 a	8,10 a	10,30 a

^z Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Aos 30 dias, maiores médias para comprimento da parte aérea (8,3 e 8,1 cm) foram obtidas nos tratamentos em que a 1 mgL⁻¹ de NAA foi associado a 5 e 10 mgL⁻¹ de putrescina, respectivamente. No tratamento em que 1 mgL⁻¹ de NAA foi associado a 1 mgL⁻¹ de putrescina e no controle (1 mgL⁻¹ de NAA), os resultados não diferiram estatisticamente entre si e foram 7,13 e 6,77 cm, respectivamente.

A correlação positiva e/ou negativa entre acúmulo de diaminas e/ou poliaminas e indução de raízes adventícias por auxinas, têm sido observada em um grande número de espécies.

Nos estudos realizados por Neves *et al.*, (2002), sobre o envolvimento de poliaminas livres e conjugadas no enraizamento adventício de brotos e plântulas micropropagadas de *Vitis vinifera*, os resultados mostraram que as estas favoreceram o enraizamento na presença e/ou ausência de auxinas. Nesse caso, as poliaminas devem estar presentes nos tecidos radiculares e favorecer o enraizamento, cojugando-se com o IAA endógeno. Logo, a presença ou não de auxinas pode não ter influência na indução de raízes para esta espécie.

Quando Roussos *et al.*, (2002), estudaram o enraizamento *in vitro* de *Koroneiki olive*, observaram que existe uma correlação entre auxinas, compostos fenólicos e

diaminas como a putrescina, durante o processo de indução de raízes *in vitro* em explantes desta espécie.

A relação do envolvimento de auxinas, diaminas e poliaminas na formação de raízes adventícias e mudanças nos compostos envolvidos no enraizamento, também foi estudada por Nag, *et al.*, (2001). Durante as três fases de enraizamento de *Vigna radiata*, indução (0-24hs), iniciação (24-72hs) e expressão (após 72 hs). Os autores observaram que a correlação existente entre os níveis de IAA e diaminas e/ou poliaminas endógenas e atividade de peroxidase é significativa, tendo em vista as mudanças consideráveis que ocorreram durante as diferentes fases. Os resultados mostraram que altos níveis de auxina e/ou diamina e/ou poliamina, estão relacionados à baixa atividade de peroxidase, onde a atividade da IAA-oxidase é inversamente proporcional ao nível endógeno de IAA. Durante as fases de indução e iniciação das raízes, ocorre um aumento simultâneo de putrescina e IAA endógenos.

Quando Tonon *et al.*, (2001), estudaram o envolvimento de diaminas e poliaminas, auxinas e atividade de peroxidase durante o processo de enraizamento *in vitro* de *Fraxinus angustifolia*, observaram a adição de diaminas e poliaminas como putrescina, espermidina e compostos como cicloexalamina, na ausência de auxina, durante a fase de indução de raiz, promoveram os melhores resultados, visto que obtiveram 100% de enraizamento. A aplicação de espermina e compostos como difluorometilornitina associado com difluormetilarginina, inibiram o enraizamento e 88% das plântulas enraizaram na presença de 20.7mM de IBA. A fase de indução das raízes foi caracterizada pelo aumento de IAA endógeno e putrescina. Entretanto, a fase de expressão das raízes, foi caracterizada pelo aumento na atividade de peroxidase e baixas concentrações de poliaminas. Os autores sugerem que o catabolismo das poliaminas, tem uma importante função durante os processos de formação e alongação das raízes.

Outros estudos também foram realizados por Arena *et al.*, (2003), Faivre-Rampant, (2001; 2003), Tamimi *et al.*, (2003) e Neves *et al.*, (2002), e confirmam envolvimento de poliaminas livres ou conjugadas com auxinas na indução de raízes adventícias em plântulas de várias espécies, estimulando ou inibindo. Faivre-Rampant *et al.*, (2001) e Neves, *et al.*, (2002), afirmam que as poliaminas e auxinas livres ou conjugadas, são os

fatores determinantes em vários processos de crescimento e desenvolvimento de brotos, como a rizogênese e Sankhla & Upadhyaya (1988) também relatam vários trabalhos neste contexto.

Os resultados obtidos com as espécies *M. velutina* e *M. illustris*, sobre a ação de diaminas e/ou poliaminas conjugadas com auxinas, podem ser melhor entendidos, quando comparados aos trabalhos descritos anteriormente.

Do mesmo modo que as brotações de *M. illustris*, podem ter um nível satisfatório de IAA endógeno que favorece a indução de raízes adventícias *in vitro*, como visto no experimento realizado com auxinas, isso também pode ocorrer em relação às diamins e/ou poliaminas. No entanto, para confirmar tal inferência, é necessário a realização de estudos bioquímicos.

Como existe uma correlação entre os níveis de IAA e diaminas e/ou poliaminas endógenas e atividade de peroxidase, sendo inversamente proporcional, pode ser que durante a fase de indução e iniciação das raízes nas brotações de *M. illustris*, tenha ocorrido um aumento nos níveis de IAA e poliaminas endógenas, mas durante a fase de expressão das raízes, um aumento na atividade de peroxidase, prejudicando o seu crescimento, como ocorrido nos trabalhos realizados por Nag *et al.*, (2001) e Tonon *et al.*, (2001), com as espécies *Vigna radiata* e *Fraxinus angustifolia*, respectivamente.

Em relação a espécie *M. velutina*, como discutido anteriormente, provavelmente, as brotações não possuem níveis de poliaminas nos tecidos radiculares, bem como, níveis suficientes de auxina endógena que possa favorecer o enraizamento. Como a ação positiva das poliaminas sobre a indução de raízes adventícias está relacionada ao nível de auxina endógeno, a conjugação poliaminas-auxinas, pode não ter influência positiva na indução de raízes, para esta espécie.

Todavia, é necessário a ampliação de estudos bioquímicos, para que se possa estabelecer de modo preciso, a relação entre a presença e/ou nível de auxina e poliamina endógena, e o seu efeito no enraizamento *in vitro* de *M. velutina* e *M. illustris* e, portanto, confirmar esta inferência.

Experimentos futuros empregando menores concentrações de diaminas e poliaminas também devem ser realizados, haja vista, uma possível toxicidade com as concentrações empregadas neste trabalho.

4) Efeito do Dithiothreitol (DTT)

A aplicação exógena de auxinas é um dos métodos mais comuns quando se busca a indução de raízes adventícias em plantas. No entanto, como já foi visto que o número de fatores que influenciam o enraizamento é significativo, a aplicação somente da auxina no meio de enraizamento pode não ser suficiente, e outras substâncias podem e devem ser utilizadas.

Segundo Auderset *et al.*, (1997), os compostos fenólicos como os complexos de thiois quando usados sozinhos ou em combinação com auxina, são substâncias que têm proporcionado um aumento considerável na indução de raízes, em espécies herbáceas e/ou lenhosas.

A ação dos compostos fenólicos na indução de raízes adventícias, está relacionada a sua ação como co-fatores de enraizamento. Esses co-fatores agem como indutor das auxinas estimulando sua síntese e aumentam sua liberação. Podem atuar também, como protetores de auxinas endógenas, servindo de substrato alternativo para a IAA-oxidase (Aloufa, 2003; Grattapaglia & Machado, 1998; Assis & Teixeira, 1998, McCown, 1988).

Quando agem como protetores de auxinas, os polímeros de ortho-dihydroxyphenols, específicos (co-fatores de enraizamento), são produzidos nas folhas e brotos e translocados à região de enraizamento, onde, junto com auxinas e polifenoloxidasas, dão origem a um complexo estimulador de enraizamento que conduz à iniciação e crescimento do primórdio radicular (Aloufa, 2003).

Um dos compostos de thiois que vem sendo empregado em pesquisas com espécies vegetais, é o dithiothreitol (DTT). Resultados interessantes têm sido obtidos com DTT em algumas espécies que apresentam dificuldade de enraizamento (Auderset *et al.*, 1997; Vasar & Svensson, 2001; Biondo *et al.*, 2004).

Os compostos de thiois, como o DTT, geralmente são empregados quando o interesse é a eliminação de espécies oxigênio reativas e a neutralização de oxidantes extracelulares (Murina *et al.*, 2005).

O emprego do DTT mostrou em efeito positivo considerável no processo de enraizamento *in vitro* das três espécies em estudo.

Mandevilla illustris

Para a espécie *M. illustris*, aos 30 dias, maior porcentagem de enraizamento (43%), ocorreu quando utilizou-se 0,25 mgL⁻¹ de DTT. Na concentração de 0,10 mgL⁻¹, assim como no controle, a porcentagem de enraizamento foi 33%. Aos 60 dias, na concentração 0,25 mgL⁻¹ de DTT, 63% das brotações apresentaram raiz, seguido de 47 e 40% no controle e na concentração 0,10 mgL⁻¹ (Tabela 17).

TABELA 17: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla illustris* em função de diferentes concentrações de dithiothreitol (DTT), aos 30 e 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

TRATAMENTO	Efeito de dithiothreitol (DTT)	
	% ENRAIZAMENTO (30 dias)	% ENRAIZAMENTO (60 dias)
0 – MS	33 ± 3,453	47 ± 4,543
1 – MS + 0,10 mgL ⁻¹ DTT	33 ± 2,744	40 ± 4,709
2 - MS + 0,25 mgL ⁻¹ DTT	43 ± 2,515	63 ± 2,694

Os resultados obtidos na análise de variância, nas avaliações realizadas aos 30 e 60 dias, mostraram que não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, para número e comprimento de raiz, mas somente para comprimento da parte aérea das brotações de *M. illustris* ($\alpha < 1\%$).

Aos 30 dias, os resultados para comprimento da parte aérea foram 4,2cm e 3,8 cm nas concentrações de 0,10 e 0,25 mgL⁻¹ de DTT, respectivamente (Figura 25).

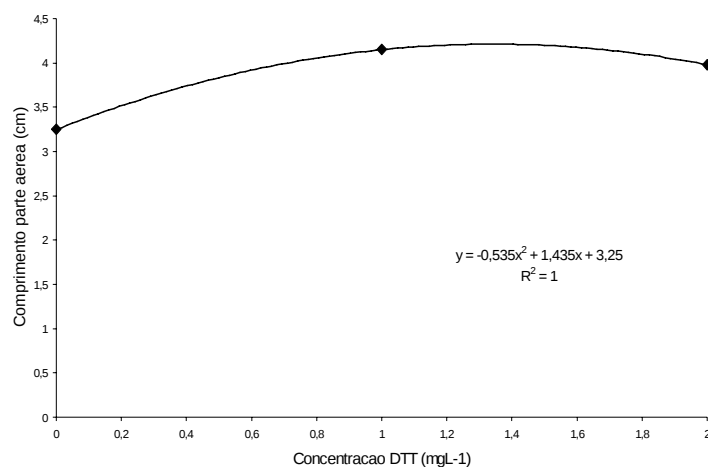


FIGURA 25: Comprimento da parte aérea de brotações de *Mandevilla illustris* em função da concentração de dithiothreitol (DTT - mgL⁻¹), aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Aos 60 dias, houve um crescimento da parte aérea. Os resultados foram 5,2 cm e 4,8 cm nas concentrações de 0,10 e 0,25 mgL⁻¹ de DTT, respectivamente (Figura 26).

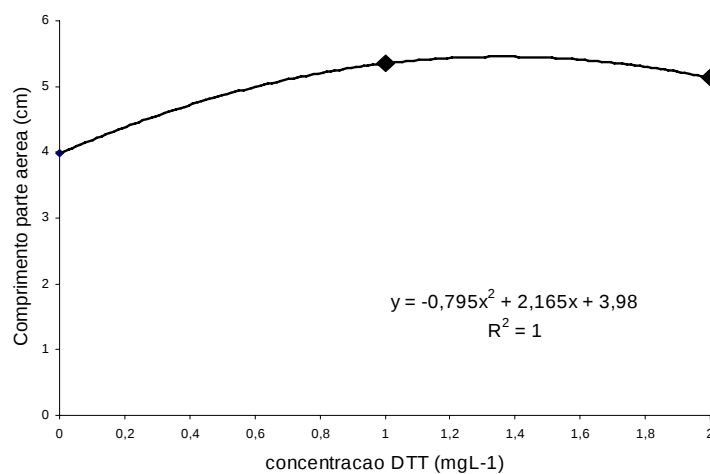


FIGURA 26: Comprimento da parte aérea de brotações de *Mandevilla illustris* em função da concentração de dithiothreitol (DTT - mgL⁻¹), aos 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Mandevilla velutina

Até o presente momento, o emprego do DTT foi a condição que possibilitou a obtenção das melhores respostas para o enraizamento *in vitro* de *M. velutina*.

Assim como para a espécie *M. illustris*, maior porcentagem foi obtida na concentração de 0,25 mgL⁻¹ de DTT. Aos 30 dias, 37% das brotações apresentaram raiz quando inoculadas em 0,25 mgL⁻¹ de DTT. Na concentração de 0,10 mgL⁻¹, assim como no tratamento 0, ou seja, no controle, a porcentagem de enraizamento foi 23%. Aos 60 dias, na concentração 0,25 mgL⁻¹ de DTT, 47% das brotações apresentaram raiz e nos outros tratamentos, a porcentagem de enraizamento foi 37% (Tabela 18).

TABELA 18: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla velutina* em função de diferentes concentrações de dithiothreitol (DTT), aos 30 e 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

TRATAMENTO	Efeito de dithiothreitol (DTT)	
	% ENRAIZAMENTO (30 dias)	% ENRAIZAMENTO (60 dias)
0 – MS	23 ± 2,529	37 ± 3,895
1 – MS + 0,10 mgL ⁻¹ DTT	23 ± 3,282	37 ± 2,529
2 – MS + 0,25 mgL ⁻¹ DTT	37 ± 1,756	47 ± 4,066

Mesmo que a porcentagem de enraizamento das brotações tenha sido inferior a 50% (Tabela 18), este resultado foi o mais satisfatório quando comparado aos resultados obtidos nos outros experimentos e nos trabalhos realizados por Biondo (2003).

Os resultados obtidos na avaliação realizada ao 30 dias, pela análise de variância, mostraram que não houve diferença estatística significativa para número e comprimento de raiz, mas somente para comprimento da parte aérea das brotações ($\alpha < 1\%$). Aos 60 dias, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, para nenhuma das características avaliadas.

Maior comprimento da parte aérea aos 30 dias (6,6 cm), foi obtido no tratamento controle. Nas concentrações de 0,10 e 0,25 mgL⁻¹, os resultados foram 6,5 e 5,8cm, respectivamente (Figura 27).

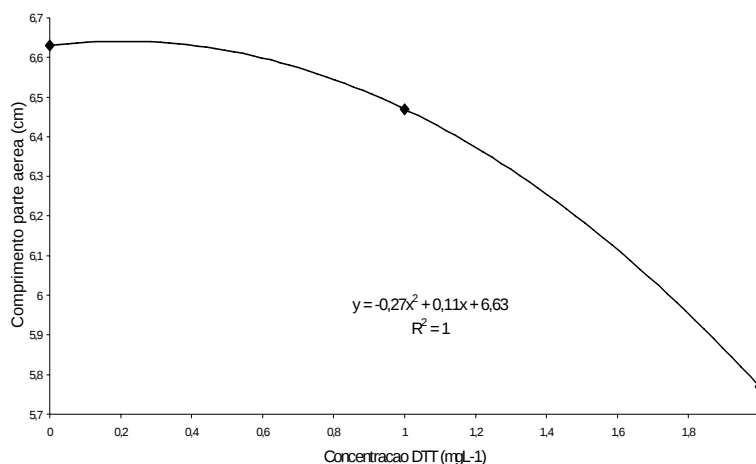


FIGURA 27 : Comprimento da parte aérea de brotações de *Mandevilla velutina* em função da concentração de dithiothreitol (DTT - mgL⁻¹), aos 30 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Anemopaegma arvense

A porcentagem de enraizamento das brotações de *A. arvense*, na presença do DTT, foi menor em todos os tratamentos, nos dois tempos de avaliação, quando comparado às espécies *M. illustris* e *M. velutina* (Tabela 19).

TABELA 19: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Anemopaegma arvense* em função de diferentes concentrações de dithiothreitol (DTT), aos 30 e 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

TRATAMENTO	Efeito de dithiothreitol (DTT)	
	% ENRAIZAMENTO (30 dias)	% ENRAIZAMENTO (60 dias)
0 – MS	0 ± 0	6,7 ± 1,704
1 – MS + 0,10 mgL ⁻¹ DTT	23 ± 2,529	36,7 ± 3,296
2 - MS + 0,25 mgL ⁻¹ DTT	13 ± 1,704	16,7 ± 1,347

Aos 30 dias, 23% das brotações apresentaram raiz quando inoculadas em 0,10 mgL⁻¹ de DTT. Na concentração de 0,25 mgL⁻¹, a porcentagem de enraizamento foi 13%. No tratamento controle, nenhuma brotação apresentou raiz. Aos 60 dias, maior porcentagem (37%), foi obtida na concentração 0,10 mgL⁻¹ de DTT, 17% na concentração 0,25 mgL⁻¹ de DTT e 6,7% no tratamento 0 (Tabela 19).

Os resultados obtidos nas avaliações realizadas aos 30 e 60 dias, pela análise de variância, mostraram que não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, para nenhuma das características avaliadas.

Biondo *et al.*, (2004), também estudaram o efeito do DTT no enraizamento *in vitro* de *Mandevilla illustris*. Mas diferentemente dos resultados obtidos neste experimento, o uso do DTT, não foi eficiente para promover o enraizamento. Melhores resultados foram obtidos quando as brotações foram inoculadas em meio MS/3 suplementado com 0.49mM de IBA.

Entretanto, resultados satisfatórios foram obtidos por Auderset *et al.*, (1997), com as espécies *Mandevilla sanderi*, *Malus domestica* e *Daphne odora*.

Nos experimentos realizados com a espécie *Mandevilla sanderi*, os autores utilizaram o ápice e segmentos nodais e observaram que as maiores médias para número de raiz/plântula e maiores porcentagens de enraizamento, ocorreram quando foi usado o primeiro explante. Na maior concentração de DTT testada, os autores obtiveram as melhores respostas. 77% e 89% das plântulas apresentaram raiz quando cultivadas em de 0.1 e 0.25mM de DTT (Auderset *et al.*, 1997).

Os melhores resultados para porcentagem de enraizamento para as espécie *M. illustris* e *M. velutina*, também foram obtidos nas maiores concentrações de DTT testadas, nas duas datas de avaliação.

Para a espécie *M. illustris*, as brotações tiveram o mesmo comportamento, ou seja, a maior porcentagem de enraizamento (63%), foi obtida quando foram expostas a maior concentração, nas duas datas de avaliação.

Para as espécies *Daphne odora* e *Malus domestica*, menores concentrações de DTT, foram mais efetivas para a indução de raízes. Maiores médias para número de raiz/plântula e maior porcentagem de enraizamento em plântulas de *Daphne odora*, foram obtidas na concentração 0.1mM, seguido de 0.25mM e 0.50mM. Para *Malus domestica*,

proximadamente 5 e 6 raízes/plântula e 91 e 96% de enraizamento, ocorreram na presença de 0.25 e 0.3mM de DTT, respectivamente (Auderset *et al.*, 1997).

Para a espécie *A. arvense*, a menor concentração de DTT testada também foi mais efetiva para a indução de raízes, porque possibilitou a obtenção da maior porcentagem de brotações enraizadas. Na concentração de 0,25mgL⁻¹, a porcentagem de enraizamento foi menor que 20%, nas duas datas de avaliação.

Os resultados obtidos com as espécies em estudo, mostram que o DTT, pode ser considerado um regulador eficiente na indução de raízes adventícias *in vitro*, mas principalmente em relação a *M. velutina*, pois até o presente momento, foi a única substância testada que possibilitou uma porcentagem de enraizamento considerável para a mesma.

O fato das três espécies terem enraizado quando cultivadas na ausência de DTT, certamente está relacionado ao tempo de exposição das plântulas durante 1 hora em 0,20 mgL⁻¹ de NAA. A porcentagem de enraizamento das espécies *M. illustris* e *M. velutina* no tratamento controle, ou seja, na ausência de DTT, foi 47% e 37% respectivamente. Desse modo, nota-se que relação de 0,20 mgL⁻¹ de NAA/tempo de 1 hora, pode ter sido a condição ótima para que ocorresse a conjugação com o AIA endógeno presente nas brotações e consequentemente a formação das raízes adventícias.

A presença do composto fenólico DTT, também pode ter sido benéfico neste contexto, haja vista, a porcentagem de enraizamento das plântulas das três espécies em estudo, nas duas concentrações testadas.

Desse modo, em experimentos futuros, seria interessante testar outras concentrações de NAA, menores que 1 mgL⁻¹ no mesmo tempo de permanência e concentrações de DTT, maiores que 0,25 mgL⁻¹ para as espécies *M. velutina* e *A. arvense*.

Outro estudo relacionando o efeito do DTT sobre a indução de raízes adventícias foi realizado por Vasar & Svensson (2005). Eles testaram o efeito de DTT juntamente com outros antioxidantes na formação de raiz e morfologia de plantas micropropagadas de *Prunus avium*, cultivares Stella e Van. As respostas foram diferentes para as duas cultivares. O uso do DTT e dos outros antioxidantes, mostrou influência positiva na morfologia das raízes somente para a cultivar Stella. Os autores ressaltam que o número e comprimento das raízes, foram maiores naquelas plantas tratadas com os antioxidantes, quando comparadas ao controle.

5) Efeito do nitrato de prata (AgNO_3) e tempo de permanência no meio de cultura

De acordo com alguns autores, existe uma relação entre etileno e AgNO_3 , e a influência do AgNO_3 na indução de raízes adventícias *in vitro*, pode estar relacionada a ação deste gás (Ilan *et al.*, 1995; Lee, *et al.*, 1997; Bais, *et al.*, 2000; Roustan & Fallot, 1990; Al-Khayri & Al-Bahrany, 2004; Naik & Chand, 2003; Kumar *et al.*, 2005).

O papel do etileno em cultura de tecidos de plantas ainda não está muito claro, mas ele pode causar algumas mudanças na capacidade organogênica de explantes *in vitro*. Para determinadas espécies, o etileno pode favorecer a formação de brotos, enquanto que para outras principalmente as arbóreas, há uma inibição na produção de brotos e enraizamento (Bais *et al.*, 2000).

As auxinas promovem a produção de etileno e a resposta fisiológica destes dois reguladores, parece ser semelhante. A alta produção de etileno está frequentemente associada com tecidos que contêm altas concentrações de auxina. Muitas respostas atribuídas à auxinas, podem ser devido a produção de etileno em resposta aos tratamentos com auxinas (Bais *et al.*, 2000). Este fato explica o efeito positivo do etileno sobre a indução de raízes adventícias em determinadas espécies.

Quando o etileno tem um efeito negativo sobre o enraizamento de uma espécie, o AgNO_3 pode ser efetivo, uma vez que inibe a produção desse gás.

Para a espécie *M. velutina*, como discutido anteriormente, os tecidos não devem possuir níveis satisfatórios de auxina endógena. Se a produção de etileno está relacionada com a concentração de auxina nos tecidos, este não deve estar exercendo nenhum efeito negativo sobre a formação de raízes nas plântulas desta espécie.

No entanto, os resultados obtidos neste experimento, mostraram que a presença de diferentes concentrações de AgNO_3 no meio de cultura e a alternância do tempo de permanência das brotações em sua presença, também não foi eficiente para promover a indução de raízes adventícias *in vitro* em brotações de *M. velutina*.

Na avaliação realizada aos 60 dias, pode-se observar pela Tabela 20, que somente 3,3% das brotações apresentaram raiz quando cultivadas em 100 mgL^{-1} de AgNO_3 , durante 10 dias. Em todos os outros tratamentos, nenhuma brotação apresentou raiz.

TABELA 20: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla velutina* em função de diferentes concentrações de nitrato de prata (AgNO_3) em diferentes tempos de permanência, aos 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO
1 - MS/2 + 10 mgL^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência 10 dias	0 ± 0
2 - MS/2 + 10 mgL^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência 15 dias	0 ± 0
3 - MS/2 + 10 mgL^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência 30 dias	0 ± 0
4 - MS/2 + 20 mgL^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência 10 dias	0 ± 0
5 - MS/2 + 20 mgL^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência 15 dias	0 ± 0
6 - MS/2 + 20 mgL^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência 30 dias	0 ± 0
7 - MS/2 + 50 mgL^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência 10 dias	0 ± 0
8 - MS/2 + 50 mgL^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência 15 dias	0 ± 0
9 - MS/2 + 50 mgL^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência 30 dias	0 ± 0
10 - MS/2 + 100 mgL^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência 10 dias	$3,3 \pm 1,347$
11 - MS/2 + 100 mgL^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência 15 dias	0 ± 0
12 - MS/2 + 100 mgL^{-1} de AgNO_3 , tempo de permanência 30 dias	0 ± 0

Pelos resultados obtidos com a análise de variância, verificou-se que não houve diferença estatística significativa para número e comprimento de raiz, para nenhuma das variáveis analisadas. A diferença estatística foi significativa ($\alpha < 1\%$), somente para o comprimento da parte aérea das brotações, nos diferentes tempos que permaneceram na presença do AgNO_3 e na interação $\text{AgNO}_3 \times$ tempo de permanência.

O desdobramento do efeito da interação de cada concentração de AgNO_3 em diferentes tempos de permanência, mostrou que o comprimento da parte aérea das brotações foi significativamente diferente ($\alpha < 1\%$), somente quando estas permaneceram por diferentes tempos na presença de 10 mgL^{-1} de AgNO_3 .

O melhor resultado para o comprimento da parte aérea das brotações de *M. velutina*, foi obtido quando estas foram cultivadas na presença de 10 mgL^{-1} de AgNO_3 durante 15 dias, onde apresentaram 7,6 cm. Quando permaneceram durante 10 dias na mesma condição, as brotações apresentaram 7 cm de comprimento. Menor comprimento (5,6 cm), foi obtido quando as brotações permaneceram durante todo o tempo na presença do AgNO_3 (Figura 28).

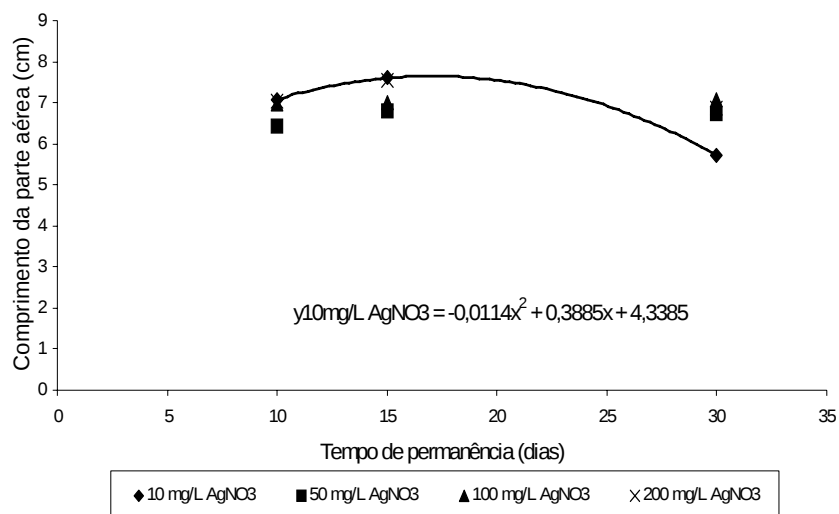


FIGURA 28: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de *Mandevilla velutina* em função da interação concentração de AgNO₃ (mg.L⁻¹) x tempo de permanência, aos 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Como a produção de etileno está relacionado a senescência e abscisão de flores e frutos, a sua produção *in vitro*, pode ter um efeito prejudicial sobre os brotos adventícios produzidos na fase de multiplicação *in vitro* causando a abscisão dos mesmos.

A relação entre produção de etileno e AgNO₃ sobre a regeneração de brotos *in vitro* de *Chrysanthemum coronarium*, foi estudada por Lee, *et al* (1997). Houve maior porcentagem de formação de brotos e maior número de gemas na concentração de 1μM de AgNO₃, os explantes que cresceram na presença ou ausência de AgNO₃ produziram altas concentrações de etileno.

Quando Naik & Chand (2003) estudaram o efeito do AgNO₃ como inibidor de etileno na regeneração de brotos de *Punica grNAAatum*, observaram que na concentração de 20 μM de AgNO₃, os explantes induzirem 57% de brotos adventícios.

No trabalho realizado com *Capsicum annuun* por Kumar *et al.*, (2005), a formação de brotos, ocorreu em meio contendo BAP, IAA e AgNO₃. O alongamento dos brotos para esta espécie e para a espécie *Citrus limon*, foi maior em meio contendo GA₃ e AgNO₃ (Kotsias & Roussos, 2001).

A influência do AgNO_3 na embriogenese somática em algumas espécies, também tem sido estudada. O efeito de diferentes concentrações de AgNO_3 na formação de calos e posterior indução de embriogenese somática em diferentes genótipos de *Phoenix dactylifera*, foi estudado por Al-Khayri & Al-Bahrany (2004). Os autores observaram que as respostas foram significativamente variáveis entre os genótipos de modo positivo e/ou negativo. Mas de uma maneira geral, neste trabalho, os autores identificaram o nível ótimo de AgNO_3 para a produção de embriogenese somática em algumas cultivares comerciais desta espécie.

Roustan & Fallot (1990), também estudaram o efeito do AgNO_3 na indução de embriogenese somática em cenoura. Os autores obtiveram um aumento no número de embriões somáticos na concentração de 10 e 20 μM de AgNO_3 , e sugerem que o AgNO_3 estimula a embriogenese somática em cenoura devido a inibição da produção de etileno.

Devido a relação existente entre AgNO_3 e a produção de etileno, e deste último com auxinas, Bais *et al.*, (2000), procuraram verificar a influência do AgNO_3 sobre a formação de raízes na espécie *Decapelis hamiltonii*. Para esta espécie, o efeito do AgNO_3 foi significativamente benéfico e diferente dos resultados obtidos com a *M. velutina*. Os autores observaram que a concentração de 40 μM de AgNO_3 , aumentou o número de raiz/broto, o comprimento das raízes e a porcentagem de enraizamento. Aproximadamente 90% das plântulas apresentaram raiz nesta concentração.

6) Efeito do ácido bórico e NAA

A influência da nutrição mineral na formação de raízes adventícias tem sido estudada por vários autores, tendo em vista que teores adequados de macro e micronutriente especialmente nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, cálcio e boro, são importantes no processo de enraizamento (Blazich, 1988; Assis & Teixeira, 1998; Ansari, *et al.*, 2004).

O efeito do boro sobre o enraizamento tem sido estudado, porque este nutriente é requerido durante a fase de iniciação e crescimento das raízes. É requerido para a manutenção da divisão celular e está relacionado com processos metabólicos, que influenciam

diretamente no enraizamento, como os níveis de auxinas endógenas e a atividade peroxidase/IAA oxidase (Blazich, 1988; Ono, 1994; Ono & Rodrigues, 1996; Josten & Kutschera, 1999).

Muitos trabalhos relatados por Ono (1994), demonstram que o boro influencia no enraizamento porque interage sinergisticamente com as auxinas NAA e IBA, quando aplicadas exogenamente, além de estar relacionado a translocação de carboidratos para os locais onde está ocorrendo o desenvolvimento e alongamento celular. A formação das raízes é iniciada pelas auxinas, mas o seu crescimento é significativamente incrementado pelo boro. O boro, geralmente é fornecido na forma de ácido bórico.

Seu principal papel pode ser a nível de planta, quando atua no controle do crescimento e diferenciação, a nível fisiológico, quando atua no controle da permeabilidade da membrana celular e translocação de açúcares e a nível bioquímico, quando atua no controle de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, polifenóis e lignina, auxinas e ácidos nucleicos. Quando atuam a níveis fisiológico e bioquímico, a cadeia metabólica que envolve o boro, está ligada principalmente com o metabolismo de hormônios, principalmente as auxinas (Ono, 1994; Ono e Rodrigues, 1996).

Para a espécie *M. velutina*, o ácido bórico, assim como a conjugação deste, com a auxina NAA, não foi eficiente para promover a indução de raízes adventícias *in vitro*, nas concentrações testadas. Nenhuma brotação apresentou raiz quando cultivada na presença de ácido bórico. Somente 3,3% das brotações apresentaram raiz quando cultivadas na presença de 1 mgL^{-1} de NAA (Tabela 21).

De acordo com os resultados obtidos através da análise de variância, aos 60 dias, verificou-se que não houve diferença estatística significativa para número e comprimento de raiz e comprimento da parte aérea, em nenhuma das variáveis analisadas.

Desse modo, pode-se inferir que o ácido bórico deve ser requerido em menores concentrações para esta espécie.

TABELA 21: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla velutina* em função de diferentes concentrações ácido bórico em diferentes tempos de permanência. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO
0 - MS/2 + 0 mgL ⁻¹ de ác. bórico + 0 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0
1 - MS/2 + 0 mgL ⁻¹ de ác. bórico + 1 mgL ⁻¹ de NAA	3,3 ± 1,347
2 - MS/2 + 0 mgL ⁻¹ de ác. bórico + 2 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0
3 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de ác. bórico + 0 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0
4 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de ác. bórico + 1 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0
5 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de ác. bórico + 2 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0
6 - MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de ác. bórico + 0 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0
7 - MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de ác. bórico + 1 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0
8 - MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de ác. bórico + 2 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0
9 - MS/2 + 50 mgL ⁻¹ de ác. bórico + 0 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0
10 - MS/2 + 50 mgL ⁻¹ de ác. bórico + 1 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0
11 - MS/2 + 50 mgL ⁻¹ de ác. bórico + 2 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0
12 - MS/2 + 100 mgL ⁻¹ de ác. bórico + 0 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0
13 - MS/2 + 100 mgL ⁻¹ de ác. bórico + 1 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0
14 - MS/2 + 100 mgL ⁻¹ de ác. bórico + 2 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0

O efeito do boro sozinho ou em combinação com reguladores vegetais foi testado em *Heliantuhs annuus* com objetivo de promover a indução de raízes adventícias. Efeito significativo deste nutriente tanto para a iniciação de raízes quanto no desenvolvimento foi observado a partir de cortes anatômicos. A presença do boro permitiu a obtenção de um significativo número de explantes com raízes (Josten & Kutschera, 1999).

De acordo com Jarvis *et al.*, (1985), a iniciação e o desenvolvimento de raízes adventícias em feijão é controlada pela interação entre auxina e ácido bórico. A combinação de IAA ou IBA com ácido bórico, permitiu a obtenção de excelentes resultados quanto o número de raiz/broto, comprimento de raiz e número de brotos enraizados. A diferença obtida nos resultados foi entre as diferentes combinações das concentrações testadas.

Um significativo número de trabalhos mostrando o efeito positivo do boro sozinho ou em combinação com auxinas no enraizamento de várias espécies é relatado por Ono (1994) e Ono e Rodrigues (1996).

No entanto, para a espécie *M. velutina*, os resultados não foram satisfatórios. Desse modo, sugerimos a realização de novos experimentos, testando outras concentrações de ácido bórico e NAA, bem como outras auxinas como IBA.

7) Efeito do floriglucinol e de NAA

Compostos fenólicos podem ser utilizados na indução de raízes adventícias *in vitro*, haja vista seu efeito positivo quando atuam como co-fatores de enraizamento. A ação desses co-fatores está relacionada com a multiplicação do efeito indutor de raiz das auxinas, porque estimulam sua síntese e aumentam sua liberação (Aloufa, 2003; Grattapaglia & Machado, 1998; Assis & Teixeira, 1998).

A estimulação ou inibição de raiz através de compostos fenólicos é devido sua interação com auxinas. Porém, estes também podem atuar independente da sua presença. Tem-se observado que a elevação de níveis endógenos de compostos fenólicos como o floriglucinol (PG) em brotos, pode favorecer a iniciação de raízes durante e a fase auxina-sensível, tendo uma ação sinérgica com a auxina (Assis & Teixeira, 1998; Aloufa, 2003).

Além da multiplicação do efeito indutor das auxinas, os compostos fenólicos também podem agir como protetores de auxinas endógenas, servindo de substrato alternativo para a IAA-oxidase (McCown, 1988; Aloufa, 2003).

Pelos resultados obtidos com a espécie *M. velutina*, na avaliação realizada aos 60 dias, notou-se que o floriglucinol teve um efeito benéfico sobre a indução de raízes adventícias *in vitro* nas plântulas de *M. velutina*.

Maior porcentagem de enraizamento (13,3%), foi obtida quando as brotações foram cultivadas na presença de 200 mgL⁻¹ de PG + 1 mgL⁻¹ de NAA. Menor porcentagem de enraizamento (3,3%), foi obtida quando as brotações foram cultivadas na presença de 50 mgL⁻¹ de PG + 1 mgL⁻¹ de NAA, ou somente na presença de 200 mgL⁻¹ de PG. Quando cultivadas na presença de 2 mgL⁻¹ de NAA, 50 mgL⁻¹ de PG, 100 mgL⁻¹ de PG + 2 mgL⁻¹ de NAA e 200 mgL⁻¹ de PG e 2 mgL⁻¹ de NAA, 6,6% enraizaram. Nenhuma brotação apresentou raiz quando cultivadas na ausência de PG ou NAA, assim como nos tratamentos 50 mgL⁻¹ de PG + 2 mgL⁻¹ de NAA, 100 mgL⁻¹ de PG e 100 mgL⁻¹ de PG + 1 mgL⁻¹ de NAA (Tabela 22).

TABELA 22: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla velutina* em função da interação floroglucinol x NAA, aos 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO
0 - MS/2 + 0 mgL ⁻¹ de floroglucinol + 0 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0
1 - MS/2 + 0 mgL ⁻¹ de floroglucinol + 1 mgL ⁻¹ de NAA	6,6 ± 2,760978
2 - MS/2 + 0 mgL ⁻¹ de floroglucinol + 2 mgL ⁻¹ de NAA	6,6 ± 1,704113
3 - MS/2 + 50 mgL ⁻¹ de floroglucinol + 0 mgL ⁻¹ de NAA	6,6 ± 2,760978
4 - MS/2 + 50 mgL ⁻¹ de floroglucinol + 1 mgL ⁻¹ de NAA	3,3 ± 1,347219
5 - MS/2 + 50 mgL ⁻¹ de floroglucinol + 2 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0
6 - MS/2 + 100 mgL ⁻¹ de floroglucinol + 0 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0
7 - MS/2 + 100 mgL ⁻¹ de floroglucinol + 1 mgL ⁻¹ de NAA	0 ± 0
8 - MS/2 + 100 mgL ⁻¹ de floroglucinol + 2 mgL ⁻¹ de NAA	6,6 ± 1,704113
9 - MS/2 + 200 mgL ⁻¹ de floroglucinol + 0 mgL ⁻¹ de NAA	3,3 ± 1,347219
10 - MS/2 + 200 mgL ⁻¹ de floroglucinol + 1 mgL ⁻¹ de NAA	13,3 ± 1,704113
11 - MS/2 + 200 mgL ⁻¹ de floroglucinol + 2 mgL ⁻¹ de NAA	6,6 ± 1,704113

Mesmo que algumas brotações de *M. velutina* tenham apresentado raiz quando cultivadas em diferentes condições com floroglucinol e NAA, de acordo com os resultados obtidos pela análise de variância, aos 60 dias, verificou-se que não houve diferença estatística significativa para número e comprimento de raiz, para nenhuma das variáveis analisadas. A diferença estatística foi significativa ($\alpha < 1\%$), somente para o comprimento da parte aérea das brotações nas diferentes concentrações de floroglucinol testadas.

De acordo com a Figura 29, pode-se observar que a medida que se aumentou a concentração de PG, o comprimento da parte aérea foi maior. Menor comprimento (10,30 cm) foi obtido na ausência de PG e maior comprimento (10,83 cm) na presença de 200 mgL⁻¹ de PG. Nas concentrações 50 e 100 mgL⁻¹ de PG, os resultados foram 10,42 e 10,56 cm, respectivamente. Nesse caso, concentrações maiores que 200 mgL⁻¹ de PG, devem ser testadas.

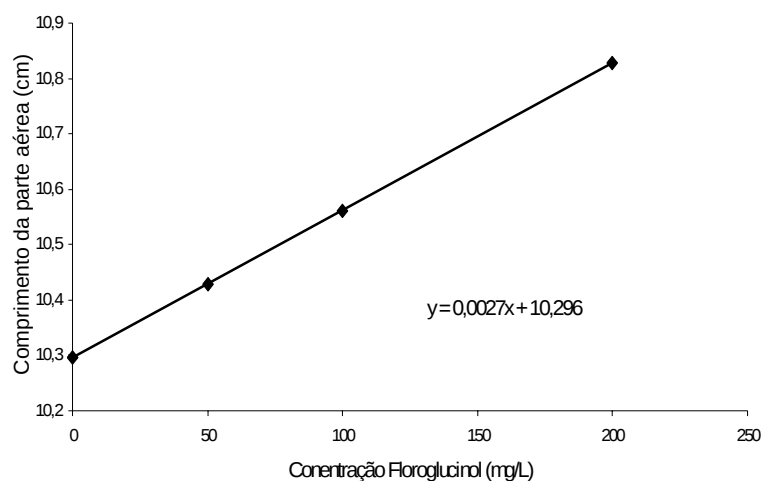


FIGURA 29: Comprimento da parte aérea (cm) de brotações de *Mandevilla velutina* em função de diferentes concentrações de floroglucinol (mg.L^{-1}), aos 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

O floroglucinol de modo geral é usado em combinação com auxinas. No entanto, os resultados obtidos são diversos entre as espécies, inibindo ou favorecendo o enraizamento adventício (Lima, 1998).

Segundo McCown (1988) o efeito de compostos fenólicos como floroglucinol são sinérgicos com auxinas, porém a resposta é dependente do genótipo e de pré condições da cultura, podendo também podem ter efeito inibitório

Grattapaglia & Machado (1998) também ressalta que existem diferenças entre os resultados, quanto a ação de fenóis sobre a indução de raízes adventícias *in vitro* e estas diferenças podem estar relacionadas aos fatores genéticos, condições fisiológicas da planta e ao tempo de exposição dos explantes à ação de fenóis e auxinas.

A influência dos fenóis na indução de raízes adventícias, na ausência de auxinas exógenas, podem ser devido ao aumento do nível de auxina endógena, ocasionado pela presença de fenóis (Lima, 1998). O que pode explicar a formação de raízes adventícias, naquelas plântulas de *M. velutina*, cultivadas somente na presença do PG.

Resultados semelhantes aos obtidos com a espécie *M. velutina*, foram relatados nos trabalhos realizados por Al-Maarri *et al.*, (1994) e por Berardi *et al.*, (1993), com

as espécies *Pyrus communis* cv Williams e *Pyrus callerana*, e nos inúmeros trabalhos citados por Lima (1998), realizados com *Mallus domestica*. A adição de floroglucinol ao meio de enraizamento, não aumentou a porcentagem de brotos enraizados.

Quando Lima (1998) estudou a ação de fenóis sozinhos ou em combinação com auxinas na indução de raízes adventícias *in vitro* em plântulas de *Eucalyptus grandis* observou que os resultados foram diferentes quanto ao tipo de fenol e/ou presença ou ausência de auxina. De uma maneira geral, o floroglucionol induziu o enraizamento na ausência de auxina. Porém, em altas doses, como também a combinação deste com auxinas em doses elevadas, promoveu uma diminuição na porcentagem de enraizamento das plântulas. O floroglucinol e o ácido clorogênico favoreceram o número de raízes e o ácido caféico e a hidroquinona mostraram valores mais altos para comprimento das raízes.

Ibañez & Amo-Marco (1998) também relatam que vários autores citam que a adição de PG em estudos *in vitro* estimulam a iniciação de raízes em maçã ou cereja e também estimulam o desenvolvimento de brotos em diferentes espécies.

Quando Modgil *et al.*, (1999), estudaram a micropropagação de maçã, cv. Tydeman's Early Worcester, observaram que a adição de 100 mgL⁻¹ de floroglucinol ao meio de enraizamento, promoveu um efeito benéfico, onde as raízes se formaram mais facilmente.

O efeito do floroglucinol como promotor de crescimento e desenvolvimento de brotos apicais também foi testado em seis genótipos de batata (*Solanum tuberosum*) em combinação com duas concentrações de sacarose. O floroglucinol favoreceu a formação de múltiplos brotos, promoveu a proliferação dos brotos axilares e estimulou a formação de raízes nos brotos. Entretanto, as respostas foram diferentes entre os genótipos (Sarkar & Naik, 2000).

Para a espécie *Pyrus pyrifolia*, a adição de floroglucinol ao meio de enraizamento aumentou a porcentagem de brotos enraizados e a sobrevivência das plântulas na fase de aclimatização (Bhojwani *et al.*, 1984).

O uso de floroglucinol em estudos de micropropagação de *Capsicum annuum* e *Minuartia valentina*, uma planta em risco de extinção, também favoreceu a proliferação e alongação dos brotos e permitiu a produção de brotos mais vigorosos (Kumar, *et al.*, 2005).

Nesse caso, nota-se que os resultados obtidos para a característica comprimento da parte aérea das plântulas de *M. velutina*, estão condizentes com a literatura, pois o floroglucinol também favoreceu o desenvolvimento da parte aérea, visto que este aumentou a medida que se aumentou a concentração de floroglucinol no meio de cultura.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que algumas brotações enraizaram somente na presença de floroglucinol ou na associação do floroglucinol com NAA. Mesmo que a porcentagem de enraizamento tenha sido baixa, esses resultados são interessantes, porque em experimentos futuros, pode-se testar floroglucinol, NAA e IBA, bem como a conjugação de floroglucinol + NAA + IBA em diversas concentrações.

O uso de outros compostos fenólicos como o catecol, o ácido clorogênico e o ácido cafeico em conjugação com NAA e IBA, também deverão ser testados futuramente.

8) Efeito da concentração de NAA e IBA e presença de carvão ativado em meio líquido e semi-sólido

O efeito do carvão ativado sobre a indução de raízes *in vitro* tem sido relatado como benéfico para um significativo número de espécies (Grattapaglia & Machado, 1998; McCown, 1988; Pasqual, 2001; Pinto & Lameira, 2001; Aloufa, 2003).

O carvão tem sido utilizado em trabalhos de enraizamento *in vitro*, porque simula uma situação de escuro no local de formação das raízes. Alguns autores ressaltam que a ausência de luz é um fator a ser considerado em trabalhos de enraizamento, porque esta condição pode ser, dentre outras, a mais favorável para a indução de raízes *in vitro*, devido a vários fatores, como a diminuição da presença de compostos fenólicos no meio de cultura, a adsorção de componentes tóxicos ao enraizamento presentes no meio, a promoção de alterações morfológicas nos tecidos, benéficas a formação de raízes, dentre outros (Grattapaglia & Machado, 1998; McCown, 1988; Aloufa, 2003).

No entanto, de acordo com McCown (1988), o efeito do carvão depende da composição química do meio e do genótipo da planta, podendo os resultados serem significativamente diferentes entre as espécies, quando este está presente no meio de enraizamento. Além das condições benéficas promovidas pelo carvão ativado, ele também

pode ser prejudicial ao enraizamento, devido a adsorção de nutrientes e reguladores vegetais, principalmente auxinas, presentes no meio de cultura e necessários à formação de raízes adventícias *in vitro*.

Para a espécie *M. velutina*, a presença do carvão ativado no meio de cultura em diferentes condições, não teve um efeito positivo para promover o enraizamento. Quando as brotações foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de NAA ou IBA em meio MS/2 líquido, somente 3,3% das brotações apresentaram raiz na presença de 1 mgL⁻¹ de NAA ou de IBA, aos 60 dias. Nenhuma brotação apresentou raiz nos demais tratamentos (Tabelas 23 e 24).

TABELA 23: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla velutina* em função de diferentes concentrações de NAA em meio MS/2 líquido com carvão ativado, aos 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO
0 - MS/2 + 100 gL ⁻¹ de carvão ativado	0 ± 0
1 - MS/2 + 100 gL ⁻¹ carvão ativ. + 1 mgL ⁻¹ de NAA ou IBA	3,3 ± 1,347
2 - MS/2 + 100 gL ⁻¹ carvão ativ. + 2 mgL ⁻¹ de NAA ou IBA	0 ± 0
3 - MS/2 + 100 gL ⁻¹ carvão ativ. + 4 mgL ⁻¹ de NAA ou IBA	0 ± 0

TABELA 24: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla velutina* em função de diferentes concentrações de IBA em meio MS/2 líquido com carvão ativado, aos 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO
0 - MS/2 + 100 gL ⁻¹ de carvão ativado	0 ± 0
1 - MS/2 + 100 gL ⁻¹ carvão ativ. + 1 mgL ⁻¹ de NAA ou IBA	3,3 ± 1,347
2 - MS/2 + 100 gL ⁻¹ carvão ativ. + 2 mgL ⁻¹ de NAA ou IBA	0 ± 0
3 - MS/2 + 100 gL ⁻¹ carvão ativ. + 4 mgL ⁻¹ de NAA ou IBA	0 ± 0

Quando as brotações foram cultivadas nas mesmas concentrações de NAA ou IBA, na presença de carvão em meio MS/2 semi-sólido, aos 60 dias, os resultados não foram muito diferentes, haja vista a baixa porcentagem de enraizamento. No experimento realizado com NAA, 3,3% das brotações enraizaram quando cultivadas somente na

concentração de 2 mgL^{-1} . Nenhuma brotação enraizou nos demais tratamentos. Na presença de IBA, 6,6% das brotações apresentaram raiz, quando cultivadas em 4 mgL^{-1} e 13,3 % em 2 mgL^{-1} (Tabelas 25 e 26).

TABELA 25: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla velutina* em função de diferentes concentrações de NAA em meio MS/2 semi-sólido com carvão ativado, aos 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO
0 - MS/2 + 100 gL^{-1} de carvão ativado	0 ± 0
1 - MS/2 + 100 gL^{-1} carvão ativ. + 1 mgL^{-1} de NAA ou IBA	0 ± 0
2 - MS/2 + 100 gL^{-1} carvão ativ. + 2 mgL^{-1} de NAA ou IBA	$3,3 \pm 1,347$
3 - MS/2 + 100 gL^{-1} carvão ativ. + 4 mgL^{-1} de NAA ou IBA	0 ± 0

TABELA 26: Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla velutina* em função de diferentes concentrações de IBA em meio MS/2 semi-sólido com carvão ativado, aos 60 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

TRATAMENTO	% ENRAIZAMENTO
0 - MS/2 + 100 gL^{-1} carvão ativado	0 ± 0
1 - MS/2 + 100 gL^{-1} carvão ativ. + 1 mgL^{-1} de NAA ou IBA	0 ± 0
2 - MS/2 + 100 gL^{-1} carvão ativ. + 2 mgL^{-1} de NAA ou IBA	$13,3 \pm 2,694$
3 - MS/2 + 100 gL^{-1} carvão ativ. + 4 mgL^{-1} de NAA ou IBA	$6,6 \pm 1,704$

De acordo com os resultados obtidos através da análise de variância, na avaliação realizada aos 60 dias, verificou-se que não houve diferença estatística significativa para o número e comprimento de raiz e comprimento da parte aérea em nenhuma concentração de NAA ou IBA testada, na presença de carvão em meio MS/2 líquido ou semi-sólido.

Muitos estudos têm mostrado o efeito positivo do carvão sobre a indução de raízes *in vitro* (Negussie, 1997; Aloufa, 2003; Grattapaglia & Machado, 1998; Bouza *et al.*, 1994).

A presença de carvão ativado no meio MS, com variações nos níveis de Fe^{2+} , Ca^{2+} e Mn^{2+} , favoreceu o enraizamento *in vitro* de *Acacia mearnsii* (Quoirin *et al.*, 2001).

O enraizamento *in vitro* de *Ensete ventricosum*, *H. speciosa*, *Psidium guajava*, *Populus x euramericana*, *Morus alba*, foi obtido na presença de carvão ativado em combinação ou não com as auxinas NAA ou IBA (Negash *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2002; Bouza *et al.*, 1994, Sharma & Thorpe, 1990).

Quando Wayne *et al.*, (1995) estudaram a micropropagação de *Cercis canadensis var. mexicana*, observaram que o enraizamento foi afetado pela concentração do meio de cultura, tipo e concentração de auxina, tempo de permanência nestas, como também pela presença e/ou ausência de carvão ativado no meio. Foi observado a necessidade de auxina para induzir o enraizamento adventício, como também, este foi favorecido pela presença do carvão ativado.

A adição de carvão ativado ao meio resultou no aumento da porcentagem de enraizamento, número de raiz e crescimento de brotos de *Juncus effusus* (Sarma & Rogers, 2000).

O efeito do carvão sobre o enraizamento *in vitro* pode ser benéfico para um número significativo de espécies, no entanto, resultados negativos também podem ser obtidos. Em alguns trabalhos, assim como para a espécie *M. velutina*, têm-se observado que o carvão ativado não apresentou efeitos positivos sobre a indução de raízes adventícias *in vitro* (Lu, 2002; Borges, *et al.*, 2001, Shibli *et al.*, 1997; Berardi & Neri, 1993; Wang, 1991).

A adição de carvão ativado ao meio, diminui o número de brotos e raízes na espécie *Morus latifolia* (Lu, 2002), ou inibiu completamente o desenvolvimento das raízes em pereira (Wang, 1991).

Os resultados obtidos com a espécie *Ananas porteanus*, conhecida como abacaxi ornamental também mostraram que ocorreu uma redução no tempo de indução, número de raízes e porcentagem de enraizamento, na presença de carvão (Borges, *et al.*, 2001).

Desse modo, nota-se que o efeito benéfico do carvão ativado sobre a indução de raízes adventícias *in vitro* pode estar relacionado a inúmeros fatores. Para a espécie *M. velutina*, os resultados podem ter sido negativos, devido a possibilidade de adsorção dos nutrientes e da auxina presentes no meio de enraizamento, haja vista, o uso de meio menos concentrado, baixas concentrações de auxinas e longo o período de exposição das brotações na presença do carvão ativado.

Contudo, deve-se ainda considerar a possibilidade do emprego do carvão ativado para o enraizamento *in vitro* desta espécie. Experimentos futuros devem ser realizados, empregando-se maiores concentrações de auxinas sozinhas ou em combinação, diferentes tipos de meio de cultura com maiores concentrações de sais, além de outras substâncias como os compostos fenólicos, sozinhos ou em combinação com auxinas.

O emprego de meios mais concentrados e maiores concentrações de auxinas na presença de carvão ativado, podem oferecer a vantagem de eliminar a necessidade de duas fases para a indução de raízes adventícias *in vitro*. Nas fases iniciais, quando há requerimento de auxina exógena, esta estaria disponível e em conjugação com o AIA endógeno, induziria a formação das raízes. A adsorção da auxina exógena pelo carvão, provocaria a sua indisponibilização no meio, e conseqüentemente, não ocorreria a toxicidade prejudicial ao crescimento das raízes *in vitro*.

Nas figuras 30, 31, 32, 33, 34 e 35, pode-se observar plântulas enraizadas de *M. illustris*, *M. velutina* e *A. arvense*.

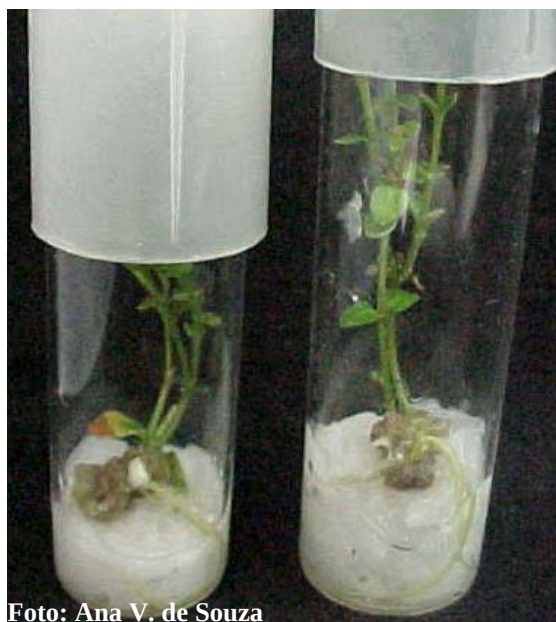


Foto: Ana V. de Souza

FIGURA 30: Plântulas de *M. illustris* enraizadas em MS/2 + 1 mgL⁻¹ de NAA com tempo de permanência de 15 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.



Foto: Ana V. de Souza

FIGURA 35: Plântulas de *M. illustris* enraizadas em MS/2 + 1 mgL⁻¹ de NAA com tempo de permanência de 15 dias. Detalhe das raízes. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.



FIGURA 36: Plântulas de *M. velutina* enraizadas em MS/2 + 1 mgL⁻¹ de NAA com tempo de permanência de 15 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.



FIGURA 37: Plântulas de *M. velutina* enraizadas em MS/2 + 1 mgL⁻¹ de NAA com tempo de permanência de 15 dias. Detalhe das raízes. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.



FIGURA 38: Plântulas de *A. arvense* enraizadas MS/2 + 2 mgL⁻¹ de NAA com tempo de permanência de 15 dias. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.



FIGURA 39: Plântulas de *A. arvense* enraizadas MS/2 + 2 mgL⁻¹ de NAA com tempo de permanência de 15 dias. Detalhe da parte aérea e das raízes. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

4.2 DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson E INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE DIFERENTES GENÓTIPOS PARA A CONSERVAÇÃO EM BANCO DE GERMOPLASMA

4.2.1 Análise da diversidade genética

4.2.1.1 Coleta

O uso do Sistema de Posicionamento Global (GPS) tem sido significativamente difundido em trabalhos de conservação e estudos de variabilidade genética em populações naturais encontrada nos diversos biomas. Sua utilização permite plotar dados de localização geográfica em mapas, correlacionar indivíduos, populações, ecossistemas, biomas com dados de topografia, geologia, pedologia, geomorfologia, hidrografia, além de permitir mapear áreas onde se encontra a maior diversidade de uma espécie (Biondo, 2003).

Na Tabela 27, pode-se verificar os dados de GPS coletados para os 67 indivíduos amostrados.

TABELA 27: Acessos de *Mandevilla velutina* utilizados no estudo da variabilidade genética por meio de marcadores RAPD. FCA – UNESP. Botucatu – SP, 2006.

Planta	Local	Estado	Latitude * (-0°0'00s)	Longitude * (-0°0'00s)	Altitude (m)
PD 1	Pedregulho	SP	20 14 14.3	47 27 29.2	974
PD 2	Pedregulho	SP	20 14 13.5	47 27 28.7	973
PD 3	Pedregulho	SP	20 14 13.5	47 27 28.7	973
PD 4	Pedregulho	SP	20 12 39.8	47 26 32.6	990
PD 5	Pedregulho	SP	20 12 39.8	47 26 32.6	990
PD 6	Pedregulho	SP	20 12 39.2	47 26 26.5	972
PD 7	Pedregulho	SP	20 12 43.4	47 26 20.9	958
PD 8	Pedregulho	SP	20 14 58.2	47 27 42.4	1002
PD 9	Pedregulho	SP	20 13 03.0	47 26 28.8	977
PD 10	Pedregulho	SP	20 12 43.0	47 26 20.9	958
SCO	São Carlos	SP	21 53 49.0	47 54 15.1	823
SC1	São Carlos	SP	21 53 53.0	47 54 14.0	873
SC2	São Carlos	SP	21 53 53.1	47 54 13.8	858
SC4	São Carlos	SP	21 53 50.9	47 54 16.0	783

SC5	São Carlos	SP	21 53 51.3	47 54 16.3	811
SC6	São Carlos	SP	21 53 50.7	47 54 16.1	809
SC7	São Carlos	SP	21 53 50.4	47 54 16.6	809
SC8	São Carlos	SP	21 53 49.6	47 54 17.8	815
SC9	São Carlos	SP	21 53 49.5	47 54 17.9	814
SC10	São Carlos	SP	21 53 49.5	47 54 17.8	813
SC11	São Carlos	SP	21 53 50.3	47 54 18.9	810
SC13	São Carlos	SP	21 53 50.3	47 54 22.2	820
SC14	São Carlos	SP	21 53 49.9	47 54 23.5	810
SC15	São Carlos	SP	21 53 50.7	47 54 23.6	804
SC16	São Carlos	SP	21 53 52.8	47 54 23.0	814
SC18	São Carlos	SP	21 53 00.5	47 54 11.7	816
A1	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
A2	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
A3	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
A4	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
A5	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
A6	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
A7	Araxá	MG	19 36 44.1	47 08 27.4	922
A8	Araxá	MG	19 36 44.4	47 08 28.9	971
A9	Araxá	MG	19 36 07.9	47 09 10.1	990
A10	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
A11	Araxá	MG	19 35 29.4	47 06 33.7	970
A12	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
A13	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
A14	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR1	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR2	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR3	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR4	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR5	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR6	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR7	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR8	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR9	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR10	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR11	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR12	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR13	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR14	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR15	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR16	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR17	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR18	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976

AR19	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR20	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR21	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR22	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR23	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR24	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR25	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR26	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976
AR27	Araxá	MG	19 35 26.5	47 06 41.1	976

4.2.1.2 Otimização do protocolo de amplificação RAPD

O cuidadoso controle das condições de amplificação avaliadas durante o processo de otimização do protocolo da PCR é muito importante para a utilização de marcadores RAPD, pois de acordo com Parker *et al.*, (1998) a técnica pode gerar artefatos que comprometem a reprodutibilidade do padrão de bandas, dificultando a interpretação dos resultados.

Entre os iniciadores avaliados, foram selecionados aqueles que permitiram a melhor intensidade de bandas e alto grau de polimorfismo (Tabela 28). Após a otimização dos parâmetros da reação em cadeia da polimerase (PCR) para o material genético em estudo, estabeleceu-se o seguinte protocolo RAPD para *M. velutina*: 3 µL de Tp 10x, 3 µL de dNTPs 2,5mM, 1,8 µL de MgCl₂ 25mM, 7 µL de iniciador 10ng/µL, 0,2 µL de Taq polimerase 5u/µL e 2 µL de DNA 5ng/µL num volume final de 30µL. A amplificação foi conduzida em termociclador: 2 ciclos de 94°C por 2 minutos, 1 ciclo de 37°C por 1 minuto, 1 ciclo de 72°C por 2 minutos e 33 ciclos de 94°C por 10 segundos, 40°C por 20 segundos (temperatura de anelamento) e 72°C por 2 minutos.

Os onze iniciadores escolhidos produziram 111 bandas, sendo a maioria polimórfica nas três populações. O número mínimo de bandas por iniciador foi 7 e o máximo 15 (Tabela 28).

TABELA 28: Iniciadores utilizados e marcadores RAPD obtidos para 67 indivíduos de *M. velutina*. FCA – UNESP. Botucatu – SP, 2006.

Iniciadores	Seqüências (5'→ 3')	Número de bandas		
		Total	Polimórficas	Monomórficas
1	CAGGCCCTTC	9	5	4
2	TGCCGAGCTG	12	12	0
3	AGGTGACCGT	8	7	1
4	GTCCACACGG	9	8	1
5	CAGCACCCAC	10	10	0
6	TCGCCCAGTG	7	6	1
7	TGCCGAGCTG	8	7	1
8	GAATATGGGTGCGCTCTG	8	8	0
9	AGGGGTCTTG	13	10	3
10	AAGGGATTGTTCTGTTTCGCTG	15	11	4
11	TGATTACACCAATTACCACG	12	8	4
Total		111	92	19

Um exemplo típico de polimorfismo detectado com iniciador 10 pode ser verificado na Figura 36.

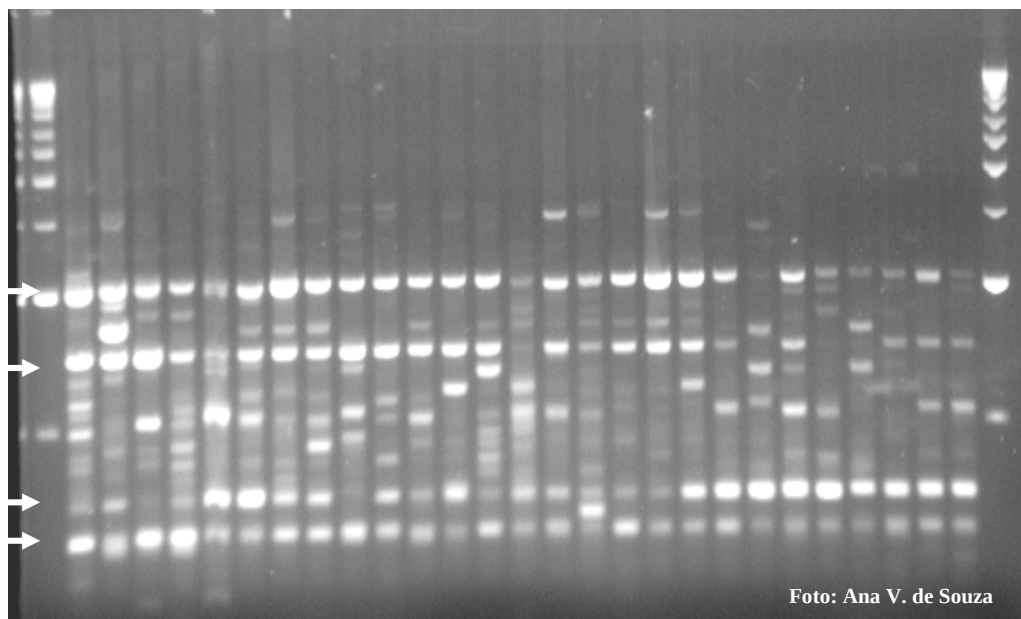


Figura 36: Perfil das bandas RAPD em populações naturais de *M. velutina* (canaletas 2 a 27 correspondendo a 10 indivíduos de Pedregulho e 16 de São Carlos) produzido pelo iniciador 10. As setas brancas representam bandas monomórficas. Marcadores de peso molecular 100 Kb e 100 pb, nas canaletas 1 e 28, respectivamente. FCA – UNESP. Botucatu – SP, 2006.

4.2.1.3 Variabilidade genética entre e dentro de populações, estrutura e distâncias genéticas

Os resultados de variabilidade obtidos com as diferentes estimativas estatísticas indicaram que o marcador RAPD foi efetivo na análise genética das três populações naturais *M. velutina* estudadas.

A caracterização genética das três populações obtidas a partir das frequências alélicas, pressupondo equilíbrio de Hardy-Weimberg para os 111 locos estudados, pode ser verificada na Tabela 29.

TABELA 29: Estatística descritiva básica das populações de *M. velutina* estudadas. Assumiu-se equilíbrio de Hardy-Weimberg. Tamanho médio da amostragem ($\bar{n}$), número de alelos observados (**Na**) e porcentagem de locos polimórficos (**P**). Resultados obtidos pelo programa POPGENE (Yeh et al. 1999). FCA – UNESP. Botucatu – SP, 2006.

População	$\bar{n}$	Na	P
PD	10	1,4955	49,55
SC	16	1,6486	64,86
AR	41	1,7748	77,48
Total	67	1,8108	81,08

Nos 67 indivíduos analisados, verificou-se um número médio de alelos de 1,8108 e uma porcentagem total de locos polimórficos de 81,089%, sendo que a população de Araxá apresentou a maior porcentagem de locos polimórficos (77,48%), seguida das populações de São Carlos (64,86%) e Pedregulho (49,55%).

De acordo com Odum, (1988), existem três tipos de diversidades: de espécies, de padrões e genética. Uma das abordagens para analisar a diversidade de espécies em estudos populacionais é o uso dos Índices de diversidade. O Índice de Shannon, geralmente é utilizado para avaliar a diversidade de espécies em comunidades ecológicas, no entanto, no caso de marcadores RAPD, pode ser usado para avaliar a diversidade genética. O Índice de Nei é considerado um índice próprio para avaliar diversidade genética através da heterozigotidade genotípica (Gillies *et al.*, 1999; Gauer & Cavalli-Molina 2000; Pattanayak, *et al.*, 2002).

De acordo com Solé-Cava (2001), de uma maneira geral, os dois métodos produzem valores virtualmente idênticos e têm sido usados igualmente em estudos populacionais.

A diversidade genética obtida pelo Índice de Shannon e de Nei pode ser verificada na Tabela 30.

Pelo Índice de Shannon, pode-se verificar que a diversidade média das populações (H_{POP}) foi igual a 0,3491 e a diversidade genética total (H_{TOT}) igual a 0,4559. A diversidade intrapopulacional (H_{POP}/H_{TOT}), foi estimada em 0,766 e a diversidade

interpopulacional ($1 - H_{POP} / H_{TOT}$) foi de 0,234. Os resultados obtidos com o Índice de Nei mostram que os valores de G_{ST} variaram entre 0,0086 e 0,8934, com um valor global interpopulacional de 0,1865 e intrapopulacional de 0,8135 (Tabela 30).

Na comparação entre os índices de Shannon e de Nei, verificou-se que as partições hierárquicas da diversidade genética em seus componentes entre e dentro das populações de *M. velutina* foram as mesmas, ou seja, a diversidade intrapopulacional foi maior que a diversidade interpopulacional em ambos os índices. Dados que foram confirmados pela AMOVA (Tabela 31).

TABELA 30: Comparação entre os Índices de diversidade genética de Shannon e de Nei nas populações de *M. velutina*. Resultados obtidos do programa POPGENE (Yeh et al. 1999). FCA- UNESP. Botucatu – SP, 2006.

Populações				Variáveis			Componentes da diversidade	
PD	SC	AR	Diversidade interpopulacional				Diversidade intrapopulacional	
Índice de Shannon								
<u>H</u>	0,2844	0,3305	0,4325	H _{POP}	H _{TOT}	1 - H _{TOT} /H _{TOT}	H _{POP} /H _{TOT}	
	± 0,31	± 0,29	± 0,27	0,3491	0,4559 ± 0,26	0,234	0,766	
Índice de Nei								
H	0,1953	0,2209	0,2937	H _S	D _{ST}	H _T	G _{ST} (=D _{ST} /H _T)	1 – G _{ST}
	± 0,22	± 0,20	± 0,19	0,2366 ± 0,03	0,0543	0,2909 ± 0,04	0,1865	0,8135

H, diversidade das bandas RAPD para cada população, considerando todas as bandas polimórficas. **H_{POP}**, média de todas **H** analisadas. **H_{TOT}**, diversidade genética para todas as populações. **h**, heterozigozidade para cada população. **H_S**, diversidade dentro de populações, calculada como a média da heterozigozidade das populações, ponderada pelos tamanhos amostrais. **D_{ST}**, diversidade entre populações. **H_T**, diversidade total (corresponde a soma de **H_S** e **D_{ST}**).

Fórmula para o cálculo do Índice de Shannon: $H = -\sum (ni/N) \cdot \log (ni/N)$, onde **ni** é o valor de importância de cada espécie e **N** é o total de valores de importância.

K

Fórmula para o cálculo do Índice de Nei: $H_T = 1 - \sum \bar{p_i}^2$, onde **p_i** é a frequência média do alelo **i** em um dado loco, na espécie como um todo.

i = 1

Segundo Solé-Cava (2001), um outro tipo de análise de estruturação de populações, que tem sido usada é a análise Molecular de Variância (AMOVA- Excoffier e Smouse, 1994). Nesta análise, a variância nas frequências alélicas é subdividida em vários componentes hierarquicamente inclusivos, como a variância entre regiões geográficas, a variância entre subpopulações, ou a variância residual entre os indivíduos.

A AMOVA baseada nos marcadores RAPD mostrou que a maior variabilidade genética está no componente intrapopulacional (81,25%), quando comparado ao componente interpopulacional (18,75%), o que torna os resultados interessantes, porque a espécie *M. velutina* apresenta cleistogamia. O valor de Φ_{ST} foi 0,188 (valor de $p < 0,001$), indicando uma estruturação significativa da variabilidade genética nestas populações (Tabela 31).

A análise de variância de frequências alélicas utilizada para avaliar a estruturação da variabilidade genética nas populações de *M. velutina* mostrou valores de θ_P que variaram de 0,027 a 0,2833, com um valor global de 0,1586 (IC a 95% 0,2251 e 0,1037) (Figura 37).

TABELA 31: AMOVA entre e dentro de populações para os 67 indivíduos de *M. velutina* **G. L.**, grau de liberdade. **S. Q.**, soma dos quadrados. **S. Q. M.**, soma dos quadrados médios. **p**, nível de significância da estimativa de variação genética, utilizando 1000 permutações. Estatística **PHI_{ST}**, variação genética estimada para fonte de variação, análoga à estatística- F_{ST} de Wright. Resultados obtidos pelos programas AMOVA-PREP 1.01 (Miller 1998) e WINAMOVA 1.04 (Excoffier, 1992). FCA- UNESP. Botucatu – SP, 2006.

Fonte de variação	G. L.	S. Q.	S. Q. M.	Componentes de variância	% do Total de variação	p	Estatística- PHI_{ST}
Entre populações	2	142,22	71,11	3,37	18,75	<0,001	0,188
Dentro de populações	61	890,84	14,60	14,60	81,25	-	-
Total	63	1033,06					

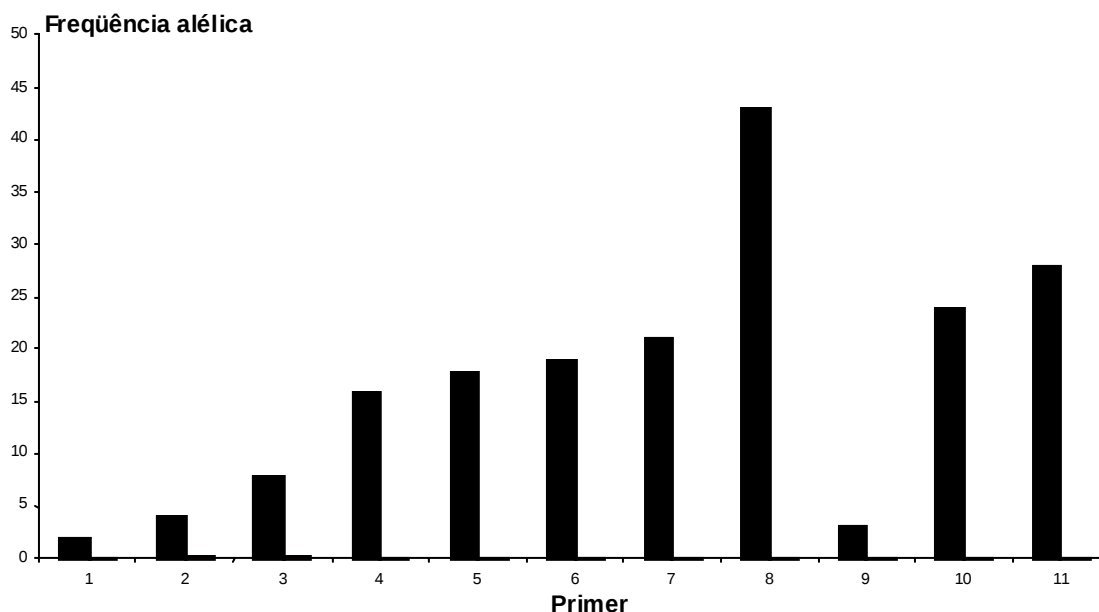


Figura 37: Gráfico do resultado da análise de variância de frequências alélicas (estimativas θ_p) para *M. velutina*, assumindo equilíbrio de Hardy-Weimberg. Essas estimativas seguem o critério Lynch & Milligan (1994), baseado da Expansão de Taylor. Resultados obtidos pelo programa TFPGA (Miller, 1997). FCA – UNESP. Botucatu, 2006.

O processo de dispersão das sementes de *M. velutina* é realizado pelo vento, uma vez que as suas sementes são leves e coroadas por denso tufo apical de pêlos finos, de 15 a 20 mm de comprimento (Almeida *et al.*, 1998), que favorece o deslocamento das sementes a grandes distâncias.

De acordo com Loveless & Hamrick (1984), a dispersão de sementes pelo vento aumenta a variação dentro das populações, mas isso depende da velocidade do vento e das características das sementes, pequenas migrações de sementes a longas distâncias podem evitar a divergência populacional.

Esses dados corroboram com os resultados obtidos para a espécie em estudo, pois a maior parte da variabilidade genética das populações de *M. velutina* foi identificada dentro da população (81,25%). Nesse caso, pode-se inferir que as populações

sejam formadas a partir de plantas distintas. No entanto, para confirmar tal afirmativa, seria interessante a realização de uma análise mais refinada de fluxo gênico via pólen e via semente, onde se definiria também o número de linhagens maternas que deram origem a estas populações.

Sendo assim, nota-se que os resultados obtidos nas metodologias foram bastante coerentes, mostrando que todos os estimadores estão capturando a mesma quantidade de informação genética nas três populações de *M. velutina* estudadas.

As populações naturais geralmente apresentam altos níveis de variação genética. Vários tipos de eventos podem levar à essa diferenciação, como colonização de um novo habitat, colonização de um novo território ou região, afunilamento populacional, mudanças genéticas por eventos estocásticos, tais como deriva genética e mutação, ou seleção natural e aspectos associados a reprodução e biologia da espécie (Solé-Cava, 2001; Solferini & Selivon, 2001; Fernandes-Matioli, 2001).

Segundo Fernandes-Matioli (2001), se for considerado apenas a influência da deriva genética nas variações das frequências gênicas, o tamanho da população interfere diretamente na magnitude da variação das frequências alélicas a cada geração. Em populações grandes os efeitos da deriva genética podem ser desprezados, ao contrário do que ocorre em populações pequenas. Toda população natural está sujeita à fragmentação em uma série de outras, não havendo como predeterminar uma forma específica de mudança nas frequências alélicas nas populações resultantes.

Sendo assim, como as populações naturais frequentemente não mantêm panmixia, ou seja, a probabilidade de reprodução entre dois indivíduos quaisquer da população não é sempre a mesma, dependendo de fatores biológicos e geográficos; estudos de estruturas populacionais têm sido significativamente útil para populações exploradas comercialmente, bem como para espécie ameaçadas de extinção, para o estabelecimento de programas de conservação.

Para estimativas Φ_{ST} , θ_P e G_{ST} significativamente diferentes de zero, valores superiores a 0,05 são considerados indicadores de alta estruturação populacional, enquanto que valores abaixo de 0,05 indicam baixa estruturação (Wright, 1978) citado por (Solé-Cava, 2001).

Como pode ser verificado nas análises de variabilidade genética entre e dentro das populações de *M. velutina* descritas anteriormente, as estimativas de variação $\mathbf{PHI}_{ST}$ (0,188), θ_P (0,1586) e $\mathbf{G}_{ST}$ (0,1865) foram superiores ao valor limite de 0,05 proposto por (Wright, 1978) citado por (Solé-Cava, 2001) indicando alta estruturação populacional, o que foi confirmado pela análise do padrão de variação espacial, que foi realizada utilizando o coeficiente de correlação de Pearson (r) entre as matrizes de distâncias genéticas de Nei e as distâncias geográficas entre populações. O valor r encontrado para as matrizes foi de 0,80227, o que é um valor relativamente alto.

De acordo com Solferini & Selivon (2001), as distâncias genéticas são medidas da diferenciação entre populações utilizando dados de frequências genotípicas. Quando analisou-se as distâncias genéticas entre as populações amostradas (Tabela 32), observou-se que estas variaram do menor valor 0,308 (distância entre Pedregulho e São Carlos) ao maior valor 0,744 (distância entre São Carlos e Araxá).

A análise de agrupamento UPGMA com base nas distâncias geográficas entre as populações, pode ser verificado na Figura 38. As populações de Pedregulho (1) e São Carlos (2), apesar de serem mais próximas geneticamente, são mais distantes no espaço geográfico. Desse modo, observa-se que não existe uma relação direta entre as distâncias genéticas e geográficas das três populações de *M. velutina* estudadas, como ocorrido nos estudos com a espécie *A. arvense* realizado por Batistini (2006).

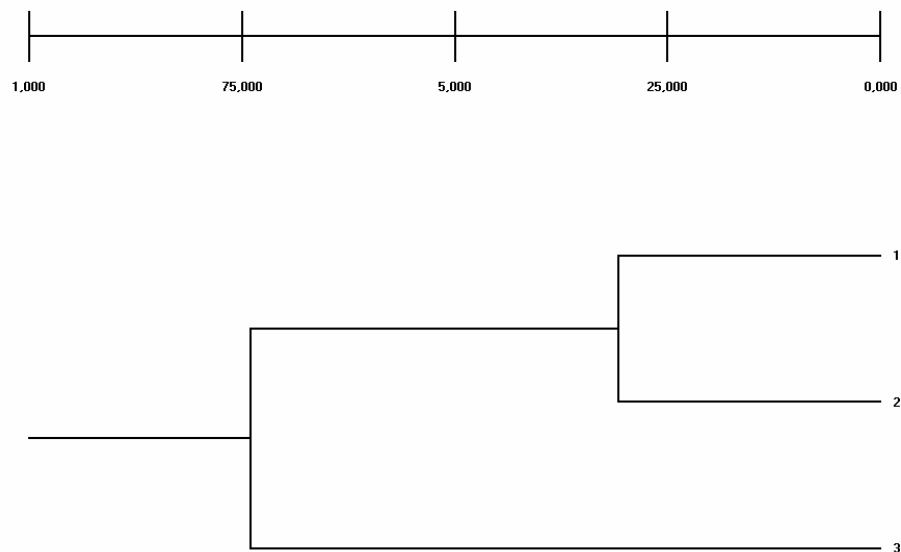


Figura 38. Padrão de divergência genética entre as três populações de *M. velutina* amostradas nos estados de São Paulo e Minas Gerais, definido pelo agrupamento UPGMA, com base nas distâncias genéticas de Nei (1978). A régua localizada acima do dendograma mede a distância genética entre as populações, ou seja, a dissimilaridade. 1 – Pedregulho, 2 – São Carlos, 3 – Araxá. FCA – UNESP. Botucatu – SP, 2006.

TABELA 32: Populações de *M. velutina* com localização geográfica, número de amostras e distâncias entre as populações.

Resultados obtidos pelo programa GPS TRACKMAKER 11.4. FCA – UNESP. Botucatu – SP, 2006.

População	Longitude	Latitude	Altitude (m)	No. de Amostras	Distâncias entre as populações (km)		
					PD	SC	AR
Município de Pedregulho (PD)	-47°26'	-20°12'	990	10		193	74,44
Município de São Carlos (SC)	-47°54'	-21°53'	809	16			272
Município de Araxá (AR)	-47°06'	-19°35'	976	41			
			Total	67			

Atualmente, inúmeros trabalhos buscando estudar a variabilidade e estrutura genética de populações naturais de várias espécies vegetais têm sido realizados: *Theobroma cacao*, *Oryza rufipogon*, *Chorisia speciosa*, *Trena micrantha* (Russell, *et al.*, 1993; Ge, *et al.*, 1999; Ribas & Kageyama, 2004; Souza *et al.*, 2004). Entre as espécies medicinais, encontra-se *Lycium barbarum*, *Illex paraguariensis*, *Digitalis minor*, *Eugenia dysenterica*, *Echinacea*, *Phyllanthus amarus*, *Curcuma longa*, *Pilocarpus microphyllus*, *Copaifera langsdorffii*, *Trichilia pallida*, *Anemopaegma arvense* (Cheng, *et al.*, 2000; Gauer & Cavalli-Molina, 2000; Sales, *et al.*, 2001; Telles, *et al.*, 2001a,b; Kapteyn & Simon, 2002; Jain, *et al.*, 2003; Pinheiro, *et al.*, 2003; Moura, 2003; Pinto, *et al.*, 2004; Zimback, *et al.*, 2004; Batistini, 2006), dentre outras.

As populações de espécies ameaçadas de extinção se encontram freqüentemente estruturadas. Devido a degradação ambiental, pode ocorrer a formação de refúgios (fragmentos), onde pequenas populações dessas espécies persistem, sem poder trocar genes com outros acessos localizados em áreas não alteradas. Portanto, a análise do padrão de variação espacial para estudos de conservação é muito importante, porque se uma espécie ameaçada que ocupa uma determinada área, apresenta-se estruturada, a estratégia de conservação deve procurar preservar a diversidade da espécie naquela área, pois já podem existir adaptações locais que se perderiam no caso de a população ser misturada com outras (Solé-Cava, 2001).

Zimback, *et al.*, (2004), ressalta do mesmo modo, que o estudo da estrutura genética de populações naturais de espécies nativas, são importantes porque permitem inferir sobre o estado atual e propor futuras medidas de manutenção do estado de conservação ou recuperação do potencial genético da espécie.

Deste modo, quando a conservação *in situ* da espécie não é possível, a conservação *ex situ* através do estabelecimento de bancos de germoplasma *in vivo* ou *in vitro* assume importância relevante.

Os valores das estimativas estatísticas obtidos para a espécie em estudo citados anteriormente, ressaltam a relevância deste trabalho e indicam a necessidade de se iniciar o programas para a conservação da *M. velutina*.

Tendo em vista a significativa dificuldade de se encontrar populações naturais de *M. velutina*, impossibilitando de certo maneira, a sua conservação *in situ*, realizou-

se a introdução de 10 genótipos para o conservação em Banco de Germoplasma *in vitro*, a fim de se estabelecer sua conservação *ex situ*.

4.2.2 Introdução dos genótipos *in vitro*

4.2.2.1 Assepsia

O protocolo de assepsia realizado nos explantes de *M. velutina* para a introdução dos genótipos *in vitro* foi desenvolvido com sucesso, pois, de acordo com as avaliações realizadas, observou-se que não houve contaminação por fungos ou bactérias nos segmentos nodais inoculados e a regeneração das plântulas ocorreu normalmente.

Após um período de sessenta dias, as plântulas de todos os genótipos foram multiplicadas em meio MS basal, até atingir um número total de 24 plântulas/genótipo (Tabela 33), que serão introduzidas no Banco de germoplasma “Cerrado *in vitro*” da Universidade de Ribeirão Preto, segundo protocolo estabelecido por Biondo (2003).

TABELA 33: Genótipos de *Mandevilla velutina* introduzidos em banco de germoplasma *in vitro*. FCA – UNESP. Botucatu – SP, 2006.

GENÓTIPO	LOCAL CIDADE - UF	DADOS GPS			Nº indivíduos banco germoplasma <i>in vitro</i>
		Latitude	Longitude	Altitude	
SCO	São Carlos - SP	21.53.49,0	47.54.15,1	823 m	24
SC2	São Carlos - SP	21.53.53,1	47.54.13,8	850 m	24
SC12	São Carlos - SP	21.53.50,3	47.54.22,2	820 m	24
Araxá	Araxá – MG	19.35.26,5	47.06.41,0	976m	24
HP2	Araxá – MG	19.43.04	49.53.54	949 m	24
I6	Itatinga - SP	23.14.54,9	48.40.35,0	676 m	24
UB 1	Uberaba – Araxá – MG	19.42.05,8	47.41.19,8	1004 m	24
Sa1	Araxá – Sacramento – MG	19.42.19,5	47.06.52,7	1104 m	24
M5	Alto Araguaia – MT	17.12.15,2	53.21.26,8	759 m	24
M1	Alto Araguaia – MT	17.12.15,2	53.21.26,8	759 m	24

4.3 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO MICORRÍZICA E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE MICORRIZA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. ex de Souza

4.3.1 Identificação das espécies

As análises realizadas com dez amostras de *A. arvense* mostraram que somente na variedade puberula, coletada no município de Mogi Guaçu – SP, não foi detectado a ocorrência de esporos de micorrizas. Em todas as outras amostras foram identificadas as espécies *Acaulospora scrubiculata*, *A. spinosa*, *A. longula*, *Scutelospora heterogama*, *Paraglomus occultum*, *Gigaspora margarita* e *Gigaspora* sp (Tabela 34).

Estes resultados estão de acordo com os relatos da literatura, haja vista, a grande diversidade de espécies de FMAs que ocorrem em regiões de cerrado nativo (Siqueira, *et al.*, 2002). Os gêneros de FMAs identificados neste trabalho, também coincidem com os resultados relatados pelos mesmos autores.

O número de esporos variou de maneira significativa entre as amostras e os locais amostrados, não havendo uma distribuição regular. A espécie *Acaulospora scrubiculata* identificada em *A. arvense* variedade puberula coletada no município de Uberaba – MG e *Escutelospora heterogama* identificada em *A. arvense* variedade petiolata coletada no município de Mogi Guaçu – SP, foram as micorrizas que apresentaram maior número de esporos, 152 e 161, respectivamente. As menores quantidades de esporos (1 e 2) foram detectadas para as espécies *Escutelospora heterogama* e *Gigaspora margarita*, nas amostras *A. arvense* variedade arvense, coletada em Ribeirão Preto – SP e *A. arvense* variedade petiolata, coleta na região de campo aberto no município de Itirapina – SP, respectivamente (Tabela 34).

Resultados semelhantes foram relatados por Araújo, *et al.*, (2004), em diferentes populações de *Eucalyptus cloeziana*, a densidade de esporos também variou de modo significativo, ficando entre 3 e 110 esporos/cm³ de solo.

TABELA 34: Identificação de espécies e contagem de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em diferentes variedades de *A. arvense* coletadas em diferentes locais. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Nº amostra	Amostra	Local	Espécie micorriza	Qtde esporo/sp	Qtde esporo total	Posição geográfica
1	<i>A. arvense</i> var. puberula (3)	Uberaba – MG	<i>Acaulospora</i> <i>scrubiculata</i>	152	152	-19°42'36,0 -47°58'57,8 796 m
2	<i>A. arvense</i> var. puberula (4)	Mogi Guaçu – SP	Não	-	-	-22°15'52,3 -47°08'36,3 624 m
3	<i>A. arvense</i> var. puberula	São Carlos – SP	<i>Acaulospora</i> <i>scrubiculata</i> <i>Paraglomus occultum</i> <i>Acaulospora spinosa</i>	32 12 8	52	-22°10'19,6 -47°47'05,8 766 m
4	<i>A. arvense</i> var. glabra (16)	Ribeirão Preto – SP	<i>Paraglomus occultum</i> <i>Glomus</i> sp <i>Gigaspora</i> sp	26 9 5	40	-21°11'15,6 -47°42'40,2 576 m
5	<i>A. arvense</i> var. glabra (33)	Ribeirão Preto – SP	<i>Acaulospora longula</i>	42	42	-21°11'15,6 -47°42'40,2 576 m
6	<i>A. arvense</i> var. glabra (33)	Ribeirão Preto – SP	<i>Acaulospora longula</i>	19	39	-21°11'15,6

	glabra (35)				-47°42'40,2
		<i>Paraglomus occultum</i>	19		576 m
		<i>Escustelospora</i> sp	1		
7	<i>A. arvense</i> var. Mogi Guaçu – SP	<i>Acaulospora longula</i>	32	79	-22°15'52,3
	petiolata (3)				-47°08'36,3
		<i>Paraglomus occultum</i>	47		624 m
8	<i>A. arvense</i> var. Mogi Guaçu – SP	<i>Escustelospora</i>	161	225	-22°15'52,3
	petiolata (2)	<i>heterogama</i>			-47°08'36,3
		<i>Paraglomus occultum</i>	53		624 m
		<i>Gigaspora</i> sp	11		
9	<i>A. arvense</i> var. Uberlândia – MG	<i>Escustelospora</i>	36	43	-19°12'31,4
	petiolata (2)	<i>heterogama</i>			-48°08'54,4
		<i>Gigaspora margarita</i>	17		881 m
10	<i>A. arvense</i> var. Itirapina – SP	<i>Paraglomus occultum</i>	18	28	-22°14'55,6
	petiolata (6) campo aberto				-47°50'00,7
		<i>Acaulospora longula</i>	8		747 m
		<i>Gigaspora margarita</i>	2		

Como a formação e o funcionamento das MAs e a ocorrência dos FMAs, podem ser influenciados direta ou indiretamente por fatores relacionados a planta, ao solo, ao ambiente e manejo do ecossistema, os resultados obtidos neste trabalho em relação a quantidade de esporos, estão de acordo com os relatos apresentados por Siqueira (1988), Grazziotti (1999), Miranda & Miranda (2001), Moreira & Siqueira (2002) e Aidar, *et al.*, (2004).

Quando Carneiro *et al.* (1998), avaliaram a incidência de FMAs em diferentes espécies da família Bignoniaceae, sob diferentes condições de cultivo, observaram que os resultados também variaram entre baixa e alta incidência. Em condições de cerrado, para a espécie *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae), a incidência das FMAs foi alta.

A presença de cobertura vegetal, a exsudação de substâncias, a idade da planta, a sazonalidade, juntamente com os fatores ligados ao solo, como nutrientes, pH e salinidade, dentre outros, podem ter influenciado diretamente a formação, a multiplicação e a manutenção de MAs, nos locais amostrados, para a espécie em estudo.

Como as condições de avaliação realizadas neste trabalho são de cerrado nativo, sem qualquer prática de manejo, pode-se inferir que a idade da planta e a exsudação de substâncias, podem estar intimamente relacionadas com a maior ou menor ocorrência das FMAs nos locais amostrados. Além da influência da sazonalidade e dos fatores do solo, juntamente com os fatores ambientais como precipitação, temperatura, presença de outros organismos, intensidade luminosa, dentre outros.

No entanto, estudos neste contexto, devem ser realizados, para estas variedades, buscando comprovar tal afirmação.

As espécies *Acaulospora scrubiculata*, *Acaulospora longula*, *Scutelospora heterogama* e *Gigaspora* sp, também foram identificadas nos estudos realizados por Alvarenga *et al.* (1999) em solos de cerrado.

A espécie *Scutelospora heterogama* identificada nas variedades glabra e petiolata, também foi identificada por Souza (2003), quando estudou a ocorrência de MAs, na espécie medicinal do cerrado *L. pinaster*.

De acordo com Miranda & Miranda (2001), condições de manejo adequado podem constituir uma alternativa viável para aumentar a eficiência de FMAs sobre o desenvolvimento de espécies vegetais. A prática da rotação de culturas é uma forma eficiente

de se manejar o FMA em campo, haja vista que pesquisas neste contexto, têm demonstrado o favorecimento da multiplicação do mesmo no solo e estimulado a formação de micorriza e de seus efeitos nas plantas.

As espécies de fungos micorrízicos *Gigaspora margarita*, *Acaulospora spinosa*, *Scutellospora heterogama*, *Gigaspora* sp., *Acaulospora scrubiculata*, *A. longula*, *Paraglomus occultum* e *Escutellospora* sp, podem ser observadas nas Figuras 39 e 40.

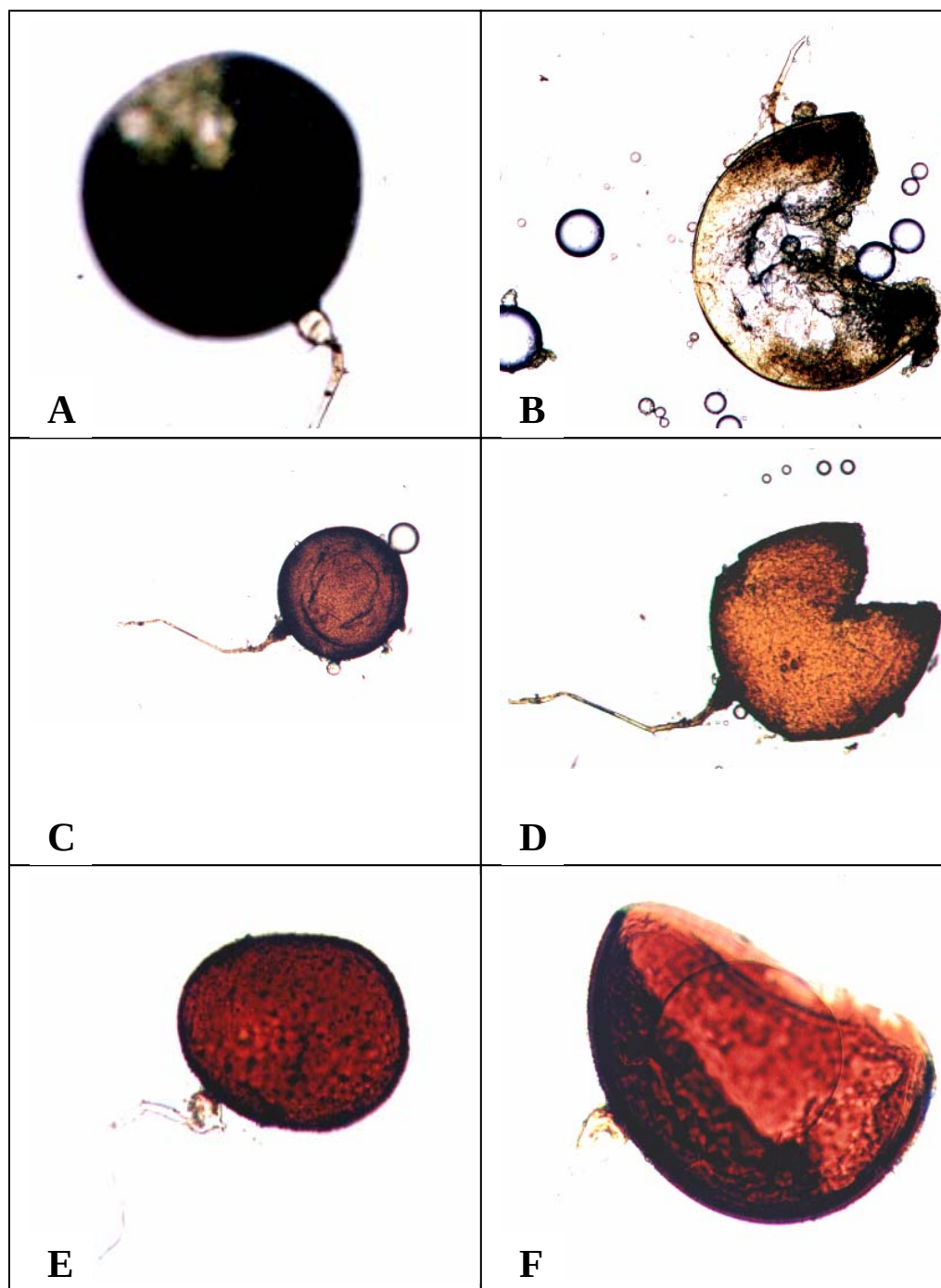


Foto:
Manoel A.
da Silva

Figura 39: Espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) identificados em *Anemopaegma arvense* (A – *Gigaspora margarita*, B – *G. margarita* rompida, C – *Acaulospora spinosa*, D – *A. spinosa* rompida, E – *cutellospora heterogama*, F – *S. heterogama* rompida). FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

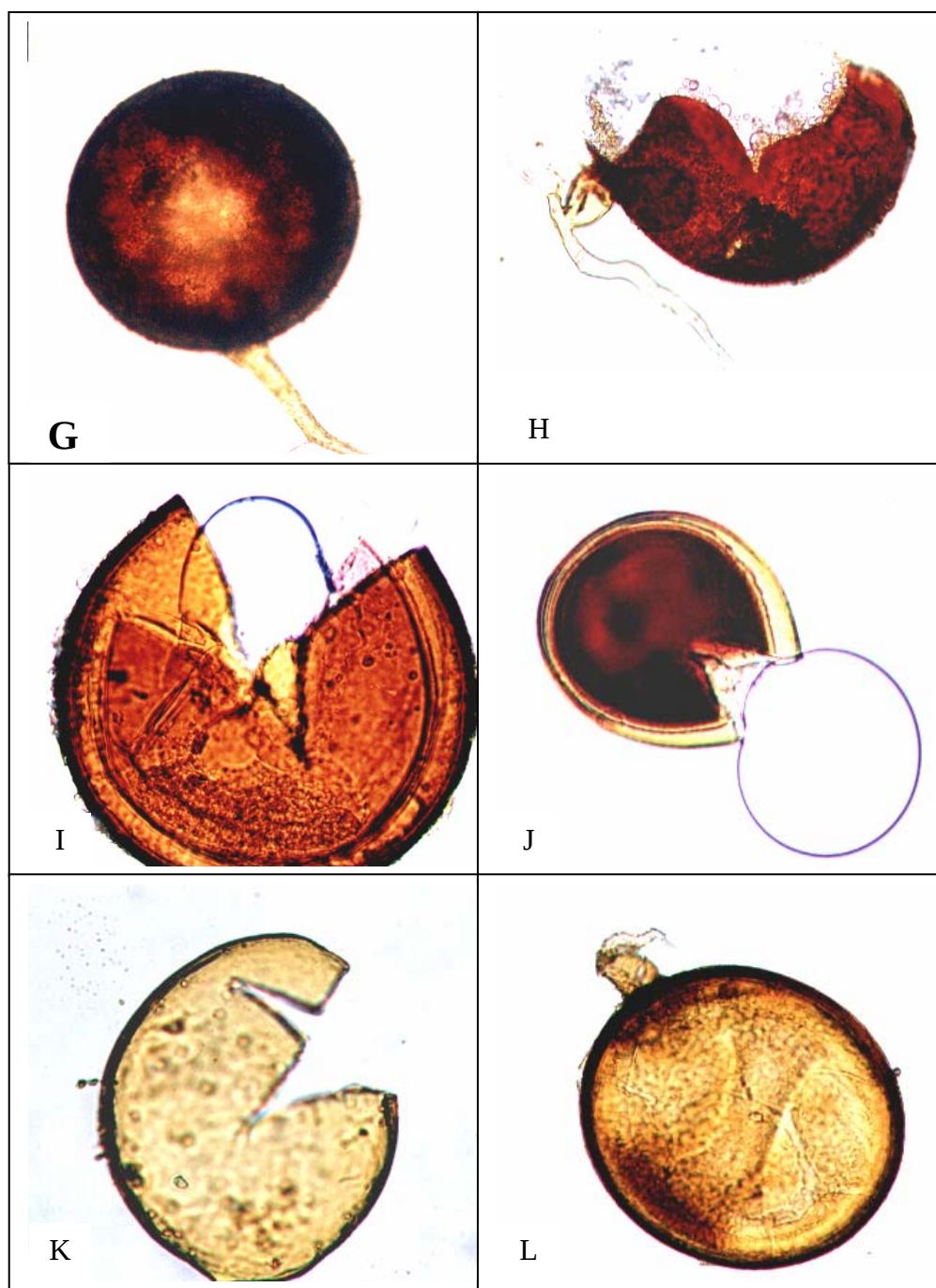


Foto:
Manoel A.
da Silva

Figura 40: Espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) identificados em *Anemopaegma arvense* (G – *Gigaspora* sp., H – *G.* sp. Rompida, I – *Acaulospora scrubiculata* rompida, J – *A. longula* rompida, K – *Paraglomus occultum* rompida, L – *Escustelospora* sp). FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

4.3.2 Avaliação da infecção micorrízica nas raízes

De modo geral, as micorrizas são classificadas de maneira simplificada em ecto e endomicorrizas. Na ectomicorriza, o fungo tem desenvolvimento intercelular no córtex da raiz da planta formando a “rede de Hartig” e apresenta um manto hifal espesso aderido externamente às raízes, que pode ser visto a olho nu. Na endomicorriza, o fungo se desenvolve inter e intracelularmente no córtex da raiz, formando estruturas fúngicas específicas dentro das células corticais. Não há formação do manto hifal externo e não ocorrem alterações morfológicas visíveis na raiz (Miranda & Miranda, 1997).

O processo de colonização das raízes pelos FMAs é caracterizado pelo crescimento intracelular das hifas no tecido cortical e pela diferenciação de hifas em estruturas semelhantes a haustórios, chamadas arbúsculos, que são estruturas típicas intra-radiculares altamente ramificadas. Em alguns grupos taxonômicos, também são formadas as vesículas (Lambais, 1996; Siqueira, *et al.*, 2002; Moreira & Siqueira, 2002; Strack, *et al.*, 2003).

Para a espécie *Anemopaegma arvense*, ocorre a formação de endomicorrizas, haja vista o crescimento intracelular das hifas no tecido cortical. No entanto, não pode-se afirmar que esta espécie seja micorrízica obrigatória, por ter sido observado um comportamento não similar entre e dentro das variedades estudadas quanto a presença de hifas.

Todas as variedades de *A. arvense* apresentaram colonização micorrízica, através da presença de hifas, no entanto a colonização não foi constatada em todas as amostras avaliadas e também não foi observado a formação de arbúsculos e/ou vesículas nas raízes analisadas (Tabela 35).

TABELA 35: Avaliação da infecção micorrízica nas raízes de diferentes variedades de *A. arvense* coletadas em diferentes locais. FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

Nº amostra	Amostra	Local	Presença hifas
1	<i>A. arvense</i> var. puberula (3)	Uberaba – MG	Sim
2	<i>A. arvense</i> var. puberula (4)	Mogi Guaçu – SP	Não
3	<i>A. arvense</i> var. puberula	São Carlos – SP	Sim
4	<i>A. arvense</i> var. glabra (16)	Ribeirão Preto – SP	Não
5	<i>A. arvense</i> var. glabra (33)	Ribeirão Preto – SP	Não
6	<i>A. arvense</i> var. glabra (35)	Ribeirão Preto – SP	Sim
7	<i>A. arvense</i> var. petiolata (3)	Mogi Guaçu – SP	Sim
8	<i>A. arvense</i> var. petiolata (2)	Mogi Guaçu – SP	Sim
9	<i>A. arvense</i> var. petiolata (2)	Uberlândia – MG	Não
10	<i>A. arvense</i> var. petiolata (6)	Itirapina – SP campo aberto	Sim

Desse modo, pode-se inferir que a espécie *A. arvense*, é micorrízica facultativa, haja vista, a colonização em todas as variedades e a identificação de um significativo número de espécies de FMAs nas plantas coletadas nos diferentes locais.

Outras razões que podem corroborar com esta colocação, pode estar relacionada às características que agrupam as espécies nesta categoria, como sistema radicular mais desenvolvido e mais eficiente na absorção de água e nutrientes do solo, e os benefícios obtidos por meio da associação em condições estressantes ao crescimento, como pode ser observado no cerrado.

Contudo, estudos mais elaborados neste contexto, devem ser realizados, para que se comprove de forma indubitável tal afirmação.

Quando os estudos de avaliação da porcentagem de colonização de raízes por FMAs são realizados em condições de ecossistemas nativos, sem práticas de manejo, como observado para a espécie em estudo, a amplitude de variação dos resultados, assim como para a variação no número de esporos, podem ser do mesmo modo justificáveis, devido as diversas influências da planta, do solo e do ambiente, discutidas anteriormente.

Segundo Araújo, *et al.*, (2004), os valores de colonização radicular e densidade de esporos, podem ser diferentes, mesmo dentro de uma mesma espécie, porque não existe apenas um fator responsável, mas um conjunto, como as propriedades físico-químicas e biológicas do solo, disponibilidade de nutrientes do solo, fatores macro e microclimáticos, estágio de desenvolvimento e genotipo das plantas, biomassa radical, proximidade com outras espécies microtróficas, espécies de FMAs presentes, expansão micelial no solo, dentre outros.

Raízes colonizadas (hifas) de *Anemopaegma arvense* var. *glabra*, var. *puberula* e var. *petiolata*, podem ser observadas nas figuras 41, 42 e 43, respectivamente.

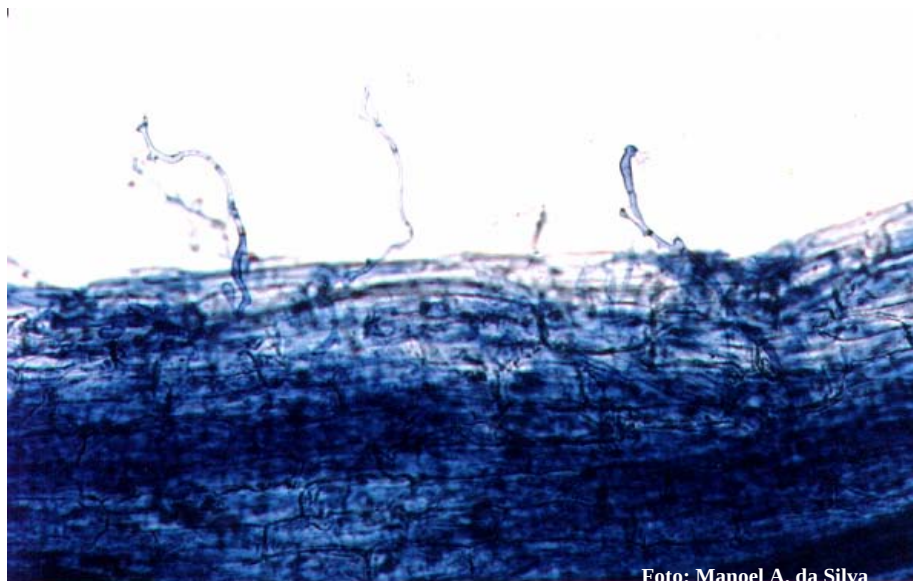


Foto: Manoel A. da Silva

Figura 41: Raiz de *Anemopaegma arvense* var. *glabra* colonizadas (hifas). FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

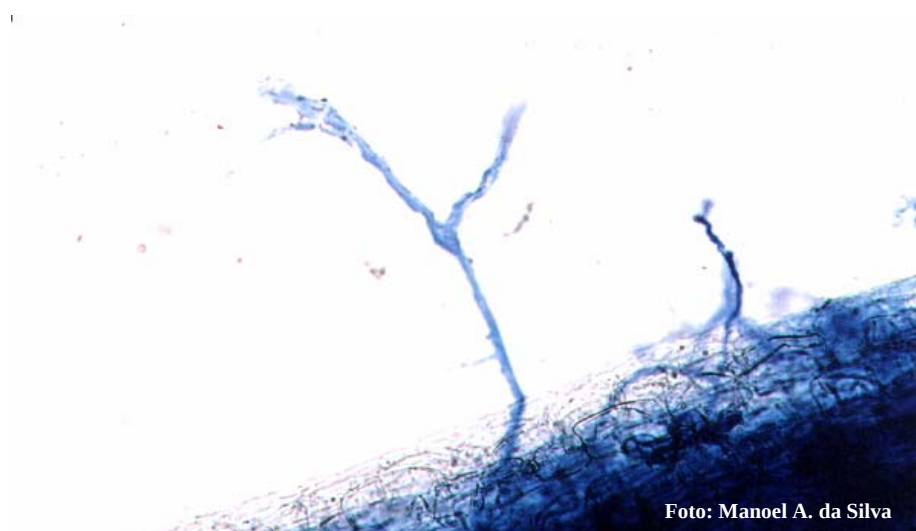


Figura 42: Raiz de *Anemopaegma arvense* var. *puberula* colonizadas (hifas). FCA - UNESP, Botucatu – SP, 2006.

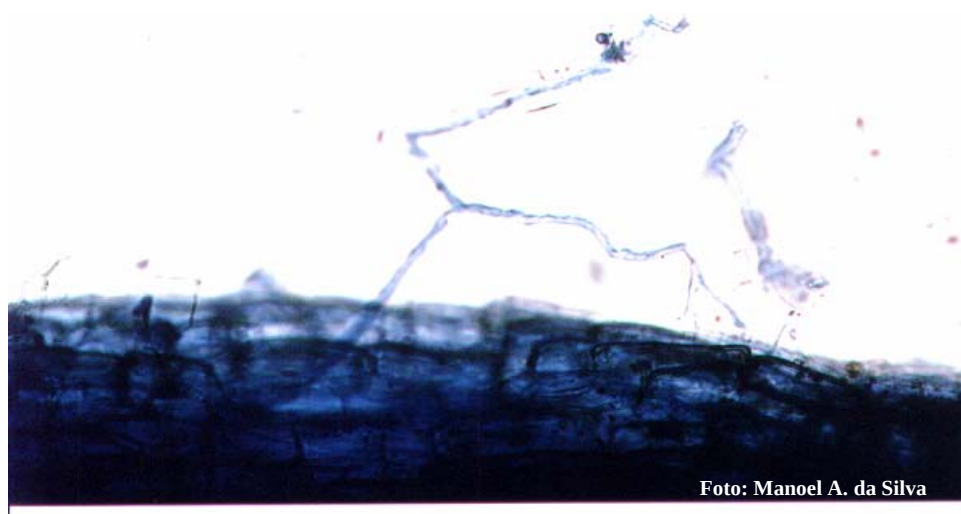


Figura 43: Raiz de *Anemopaegma arvense* var. *petiolata* colonizadas (hifas). FCA - UNESP, Botucatu - SP, 2006.

5. CONCLUSÕES

5.1 ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. ex de Souza, *Mandevilla illustris* (Vell.) R. E. Woodson e *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson

- As espécies *A. arvense*, *M. illustris* e *M. velutina*, comportam-se de maneira diferente quanto a indução de raízes adventícias *in vitro*, quando submetidas a ação de substâncias empregadas para tal finalidade em estudos de cultura de tecidos;
- Os resultados obtidos com as espécies *M. illustris* e *M. velutina*, mostraram claramente a influência do genótipo na indução de raízes adventícias *in vitro*. A aplicação exógena de auxinas como o NAA em baixa concentração por um período de quinze dias, foi suficiente para que ocorresse o enraizamento satisfatório (> 70%) de *M. illustris*. Para a espécie *M. velutina*, não houve enraizamento nestas mesmas condições.
- A conjugação auxina-fenol foi importante para promover o enraizamento das espécies em estudo. Desse modo, pode-se inferir que, esta condição, seja também adequada para muitas outras espécies endêmicas do cerrado, porque o uso de auxina exógena estimula a produção de auxina endógena e os compostos fenólicos quando atuam como co-fatores de enraizamento, também estimulam a produção de auxina e aumentam a sua liberação, além e agir como protetores de auxinas endógenas, contra a atividade da AIA/oxidase.

5.2 DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson E INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE DIFERENTES GENÓTIPOS PARA A CONSERVAÇÃO EM BANCO DE GERMOPLASMA

- O marcador molecular RAPD foi eficiente na avaliação da diversidade genética das três populações de *M. velutina* estudadas;
- Os resultados da análise genética mostraram claramente que esta espécie está ameaçada de extinção, provavelmente enquadrando-se na categoria vulnerável, sendo, portanto imprescindível a realização de um programa para a conservação de *M. velutina* para que as plantas não sejam extintas dentro de poucos anos;
- A assepsia utilizada nos explantes de *M. velutina* foi eficiente e possibilitou a introdução *in vitro* de diferentes genótipos para o posterior estabelecimento do banco de germoplasma.

5.3 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO MICORRÍZICA E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE MICORRIZA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. ex de Souza

- O estudo da rizosfera de plantas de *A. arvense* mostrou que existe uma grande variedade de gênero e espécies de micorrizas. Essa diversidade pode explicar a grande adaptabilidade dessa espécie a diferentes tipos fitofisionômicos do Cerrado, o que torna sua distribuição ampla.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDAR, M. P. M., CARRENHO, R., JOLY, C. A. Aspects Arbuscular Mycorrhizal Fungi in na Atlantic Forest Chronosequence Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR), SP. **Biota Neotropica**, v.4, n.2, p.1-15, 1994.

AL-BAHRANY, S. A.M. Effect of phytohormones on in vitro shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. **Scientia Horticulturae**. v.95, n.4, p.285-295, 2001.

AHÉE, J.; DUHOUX, E. Root culturing of *Faidherbia=Acacia albida* as a source of explants for shoot regeneration. **Plant Cell and Organ Culture** 36: 219-225, 1994.

AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. Arbuscular Mycorrhizal Fungus-promoted Accumulation of Two New Terpenoids in Cucumber Roots. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 66 (4), 762-769, 2002.

AL-KHAYRI, J. M. *In vitro* germination of somatic embryos in date palm: effect of auxin concentration and strength of MS salts. **Current science**, vol. 84, no.5, 2003.

AL-KHAYRI, J. M.; AL-BAHRANY, A. Genotype-dependent in vitro response of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars to silver nitrate. **Scientia Horticulturae**. 99 (2004) 153-162.

AL-MAARRI, K.; ARNAUD, Y.; MIGINIAC, E. Micropropagation of *Pyrus communis* cultivar 'Pease Crassane' seedlings and cultivar 'Williams': factors affecting root formation in vitro and ex vitro. **Scientia Horticulturae** 58 (1994) 207-214.

ALMEIDA, J. L.; ALMEIDA, F. C. G.; NUNES, R. P.; ALMEIDA, F. A. G. Indução de enraizamento na micropropagação de urucueiro. **Untitled Ver. Fac. Agron. (maracay)** 21: 129-135, 1995.

ALMEIDA JR., J. M. G. de. Uma proposta de ecologia humana para o Cerrado. In: PINTO, M. N. (Org) **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. 2. ed. rev. atual. Brasília: UNB, 1993. p. 569-583.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: Espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p..

ALOUFA, M. A. I. Enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas: Dificuldades e soluções. In: XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas. Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.

ALVARENGA, M. I. N.; SIQUEIRA, J. O.; DAVIDE, A. C. Teor de carbono, biomassa microbiana, agregação e micorriza em solos de cerrado com diferentes usos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.3, p.617-625, 1999.

ANAND, A.; RAO, C. S. A rapid propagation protocol for *Piper barberi* Gamble, a critically endangered plant. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant** 36: 61-64, 2000.

ANAON, R. Survey of exting Data im ex situ.. Collections of plant genetic resources for food and agriculture. Food and Agriculture Organization, Roma, 1994.

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urudueval* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, 2000.

ANSARI, S. A.; SINGH, S.; RANI, A. Inorganic salts influence IAA ionization and adventitious rhizogenesis in *Pongamia pinnata*. **Journal of plant physiology**. 161. 117-120 (2004).

APPEZZATO, B. **Desenvolvimento anatômico e propagação vegetativa de *Mandevilla velutina* var. *glabra* (Muell. – Arg.) Woodson – Apocynaceae**. 1988. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; ESTELITA, M. E. M.; The developmental anatomy of the subterranean system in *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson and *Mandevilla velutina* (Mart. Ex Stadelm) Woodson (Apocynaceae). **Revista Bra Bot** 23(1):27-35, 2000.

ARAÚJO, C. V. M., et al. Micorriza arbuscular em plantações de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell no litoral norte da Bahia, Brasil. **Acta Bot. Bras.** 18 (3): 513-520, 2004.

ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M. E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, S. R. (Ed.) **Biologia Molecular e conservação**. Ribeirão Preto:Editora Holos, 2001. p.143-152.

ARIKATI, N. A.; JAWAD, F. M.; KARAM, N. S.; SHIBLI, R. A. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**. 100 (2004) 193-202.

ARNHOLDT-SCHITT, B. RAPD analysis: a method to investigate aspects of the reproductive biology of *Hypericum perforatum* L. **Theor Appl Genet** (2000) 100:906-911.

ASHBURNER, G. R.; THOMPSON, W. K.; HALLORAN, G. M. RAPD analysis of South Pacific coconut palm populations. **Crop Science** 37: 992-997, 1997.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998, v.1, p. 261-296.

ÁVILA, F. **Guia ilustrado de plantas do Cerrado de Minas Gerais**. Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG). Empresa das Artes. 2001. 96 p.

AUDERSERT, G., *et al.* Stimulation of root formation in difficult-to-root woody cuttings by dithiothreitol. **International Journal of Plant Sciences**. 158 (2) 132-135, 1997.

BABU, K. N.; ANU, A.; REMASHEREE, A. B. PRAVEEN, K. Micropropagation of curry leaf tree. **Plant Cell, tissue and Organ Culture** 61: 199-203, 2000.

BAIS, PAL HARSH, *et al.* Silver nitrate influences *in vitro* root formation in *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn. **Current Science**, vol 79, n. 6, 2000.

BAJAJ, Y. P. S.; FURMANOWA, M.; OLSZOWSKA, O. Biotechnology of the Micropropagation of Medicinal and Aromatic Plants. In: BAJAJ, Y. P. S. **Medicinal and Aromatic Plants**. 1988. v. 1, p. 60-103. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 4)

BATISTINI, A. P. **Diversidade morfológica, genética e química de populações naturais de *Anemopaegma arvense* (Vell.) Steff.** 2006. 96p. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal- SP.

BDT: **Base de Dados Tropical.** Disponível em: <http://www.bdt.fat.org.br/iScan?278+edora+1+0+Anemopaegma> bAND barvense. Acesso em 20/05/2004.

BELLO, C. M.; MAURMANN, N.; LUZ, D. I. *et al.* Otimização da micropropagação e enraizamento de *Valeriana glechmifolia* MEYER. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD.

BENTO, E. S., *et al.* The structure of velutinol A is (15R, 16;r, 20S)-14,16: 15,20: 16,21-triepoxy-15,16-seco-14beta, 17alfa-pregn-5-ene-3beta, 15-diol. A combined quantitative Overhauser effect and molecular modelling study. **J. Chem. Soc. Perkin Trans.** 2(7) 1359-1366, 1996.

BERARDI, G.; INFANTE, R.; NERI, D. Micropropagation of *Pyrus calleryana* Dcn. From seedlings. **Scientia Horticulturae** 53 (1993) 157-165.

BERBARA, R. L.; FONSECA, H. M. A. C. Colonização radicular e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. In: SIQUEIRA, J. O. **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas.** Lavras: Universidade Federal de Lavras/DCS e DCF, 1996. p. 39-65.

BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOS, M. G.; *et al.* Micropropagação de *Tournefortia paniculata* Cham. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** Botucatu, v.3, n.1, p. 43-49, 2000.

BERTONI, B. W. **Propagação, variabilidade genética e química de *Zeyheria montana* Mart.** 2003. 165p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal.

BHATT, I. D.; DHAR, UPPEANDRA. Combined effect of cytokinins on multiple shoot production from cotyledonary node explants of *Bahuinia vahlii*. **Plant Cell and Organ Culture** **62**: 79-83, 2000.

BHATTACHARYA, N. C. Enzyme activities during adventitious formation. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 88-101.

BHAU, B. S.; WAKHLU, A. K. Effect of genotype, explant, type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. **Plant Cell and Organ Culture** **66**: 25-29, 2001.

BHOJWANI, S. S.; MULLINS, K.; COHEN, D. In vitro propagation of *Pyrus pyrifolia*. **Scientia Horticulturae** **23** (1984) 247-254.

BIONDO, R. **Avaliação da Variabilidade Genética, das Propriedades Antiofídicas e conservação in vitro de mandevilla velutina (Mart) Woodson**. 2003.119p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

BIONDO, R.; SOARES, A. S.; BERTONI, B. W. *et al.* Direct organogenesis of *Mandevilla illustris* (Vell) Woodson and effects of its aqueous extract on the enzymatic and toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Plant Cell Report**. **22**:549-552, 2004.

BITTENCOURT, J. V. M **Variabilidade genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD**.58p.Curitiba,2000. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal do Paraná .

BLAZICH, F. A. Chemicals and Formulations Used to Promote adventitious Rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 132-149.

BLAZICH, F. A. Mineral Nutrition and Adventitious Rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 61-69.

BONILLA, M. G. O. **Propagação in vitro, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudaea viburnoides* (CHAM.) BENTH.** 2002. 262p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J. L.; LUIS-GARCIA, A. Genotype affects the morphogenic response *in vitro* of epicotyl segments of *Citrus* rootstocks. **Annals of Botany**. 86:159-166, 2000.

BORÉM, A. Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 3ª ed. – Viçosa: UFV, 2001. p. 371-393.

BORGES, N. S. S.; CORREIA, D.; LIMA, R. N. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de brotos de abacaxi ornamental *Ananas porteanus* Hort Veirch ex c. Koch. **Embrapa**. Recomendação Técnica, 25, Brasília, 2001.

BORTHAKUR, M.; DUTTA, K.; NATH, S. C.; SINGH, R. S. Micropropagation of *Eclipta alba* and *Eupatorium adenophorum* using a single-step nodak cutting technique. **Plant Cell and Organ Culture** 62: 239-242, 2000.

BOSA, N.; CAVETE, E. O.; SUZIN, M.; BORDIGNON, L. Avaliação do crescimento de *Gypsophila paniculata* durante o enraizamento *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n.3, 510-513, 2003.

BOUSA, L.; JACQUES, M.; MIGINIAC, E. Requeriments for in vitro rooting of *Paeonia suffruticosa* Andr. Cv. ‘Mme de Vatry’. **Scientia Horticulturae** 58 (1994) 223-233.

BOUSSELMANE, F.; KANNY, L.; CHLYAH, H. Optimisation des conditions de culture pour l'enracinement *in vitro* de l'arganier (*Argania spinosa* L.). **Life sciences**. 324 (2001) 995-1000.

BRIAN, K. M.; BASSUK, N. L. Etiolation and Banding Effects on Adventitious Root formation. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 30-46.

BRITO, M. A. A estratégia de conservação *in situ* (unidades de conservação) e a conservação de plantas medicinais. In: COELHO, M. F. B.; JÚNIO, P. C.; DOMBROSKI, J. L. D. Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais : **anais do I Seminário Matogrossense de Etnobiologia e Etnoecologia e II Seminário Centro-Oeste de Plantas Medicinais**. Cuiabá: Unicen, 2003. p. 137-148.

BRITO, A. R. M. S.; BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, 39 (1993), 53-67.

CALIXTO, J. B.; NICOLAU, M.; YUNES, R. A. A selective antagonist of bradykinin action from a crude extract of *Mandevilla velutina*. Effect on isolated rat uterine smooth-muscle. **Braz J Med Biol Res** 18: (5-6) A728-A728, 1985.

CALIXTO, J. B.; NICOLAU, M.; TREBIEN, H.; *et al.* Antiedematogenic actions of a hidroalcoholic crude water-alcohol extract of *Mandevilla velutina*. **Braz J Med Biol Res** 19: (4-5) A575-A575, 1986.

CALIXTO, J. B.; NICOLAU, M.; PIZZOLATTI, M. G. ; *et al.* Kinin antagonistic effect of compounds from *Mandevilla velutina* in the rat isolated uterus. **Br j Pharmacol** 91: (1) 199-204, May 1987.

CALIXTO, J. B.; SILVA, A. L.; REIS, M. S.; *et al.* The competitive antagonist activity of compounds from *Mandevilla velutina* on Kinin-induced contractions of rat uterus and guinea-pig ileum *in vitro*. **Br J Pharmacol** 94: (4) 1133-1142, Aug 1988.

CAMPOS-MOTA, L., *et al.* Fertirriego Y Micorriza en Frambuesa Roja Cultivada en Tapetate. **Agrociência**, v. 38, n.1, p.75-83, 2004.

CARNEIRO, M. A. C. *et al.* Fungo micorrízico e superfosfato no crescimento de espécies arbóreas tropicais. **Scientia Forestalis**, n.50, 21-36, 1996.

CARNEIRO, M. A. C. *et al.* Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência no sudeste do Brasil. **Cerne**, v.4, n.1, 129-145, 1998.

CATAPAN, E.; OTUKI, M. F.; VIANA, A. M. *In vitro* culture of *Phyllanthus caroliniensis* (Euphorbiaceae). **Plant Cell and Organ Culture** 62: 195-202, 2000.

CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. L.; MÜLLER, N. T. G.; *et al.* Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, V. 34, n. 2, p. 181-186, 1999.

CHATURVEDI, R.; RAZDA, M. K.; BHOJWANI, S. S. *In vitro* clonal propagation of na adult tree of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) by forced axillary branching. **Plant Science** 166 (2004) 501-506.

CHEE, P. P. Stimulation of adventitious rooting of *Taxus* species by tiamine. **Plant Cell Reports** (1995) 14:753:757.

CHEN, B.; CHRISTIE, P.; LI, X. A modified glass bead compartmet cultivation system for studies on nutrient and trace metal uptake by arbuscular mycorrhizal. **Chemosphere** 42 (2001), 185-192.

CHEN, C.; CHEN; S.; SAGARE, A. P.; TSAY, H. Adventitious shoot regeneration from stem internode explants of *Adenophora triphylla* (Thunb.) A. DC. (Campanulaceae) – na important medicinal herb. **Bot. Bull. Acad. Sin.** (2001) **42**: 1-7.

CHEN, K.; *et al.* RAPD analysis of *Lycium barbarum* medicine in Taiwan market. **Bot. Bull. Acad. Sin.** (2000) 41:11-14.

CHEN, S. J.; KAO, C. H. Polyamines in relation to amonium-inhibited growth in suspension-cultured rice cells. **Bot. Bull. Acad. Sin.** (1996) 37, 197-2000.

CIAMPI, A.Y. Uso de marcadores moleculares nos estudos de genética de populações de espécies florestais. In : III SIMPOSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE. Londrina, IAPAR, 2001. **Anais.** 2001. 19-22p.

CLAIR, S. B.; LYNCH, J. P. Base cation stimulation os mycorrhization and photosynthesis of sugar maple on acid soils are aoupled by foliar nutrient dynamics. **New Phytologist**, (2005), 165:581-590.

COELHO, M. C. F. de. **Germinação de sementes e propagação "in vitro" de Sucupira Branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]**. 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

COMPTON, M. E.; PIERSON, B. L.; STAUB, J. E. Micropropagation for recovery of *Cucumis hystrix*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** **64**: 53-67, 2001.

CORRÊA, L. da R.; FETT-NETO, A. G. Effects of temperature on adventitious root development in microcuttings of *Eucalyptus saligna* Smith and *eucalyptus globulus* Labill. **Journal of Thermal Biology**. 29 (2004) 315-324.

CORREIA, J. R. Solos, paisagem e conservação da biodiversidade do Cerrado. In: IORIS, E. **Plantas Medicinais do Cerrado: perspectivas comunitárias para a saúde, o meio ambiente e o desenvolvimento sustentável.** Anais do Workshop Plantas Medicinais do Cerrado. Mineiros. 1999. p127-148.

COSTA, M. C. C. Inoculum density of arbuscular mycorrhizal fungi needed to promote growth of *Hancornia speciosa* Gomes deedlings. **Fruits** 58 (2003), 247-254.

COUÉE, I. *et al.* Involvement of polyamines in root development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** . 76: 1-10, 2004.

COUTINHO, L. M. O bioma cerrado. In: KLEIN, A. L. **Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois.** São Paulo: Editora Unesp; Imprensa Oficial do Estado, 2002. 156p.

CUENCA, S.; AMO-MARCO, J. B. *In vitro* propagation of two spanish endemic species of *Salvia* through bud proliferation. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant** 36: 225-229, 2000.

CUZZUOL, G. R. F.; GALLO, L. A. CROCOMO, O. J. Enraizamento de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro* e *ex vitro*. **Scientia Agricola**. Vol.53, n.1, 1996.

DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings.** Portland – Oregon, 1988, v.2, 315p.

DAVIS, T. D.; SANKHLA, N. Effect of Shoot Growth Retardants and Inhibitors on Adventitious Rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings.** Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 174-184.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus (Rockville)**, v. 12 (1), p.13-15, 1987.

DURIGAN, G., *et al.* **Plantas do Cerrado Paulista: Imagens de uma paisagem ameaçada.** São Paulo: Páginas & Letras Editora Gráfica, 2004. 475p.

EBRAHIM, M. K. H.; IBRAHIM, I. A. Influence of medium solidification and pH value on in vitro propagation of *Maranta leuconeura* cv. Kerchoviana. **Scientia Horticulturae** 86 (2000) 211-221.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variant inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**. V.131, p.479-491, 1992.

EXCOFFIER, L. **WINAMOVA 1.04: ANALYSIS OF MOLECULAR VARIANCE** (Programa para computadores livre distribuído pelo autor). Disponível em: http://www.tien.utk.edu/~gross/WWW_pt2d.html. Acesso em fevereiro de 2005.

FAIVRE-RAMPANT, O.; *et al.* The recalcitrant to rooting of the micropropagated shoots of the tobacco mutant: Implications of polyamines and of the polyamine metabolism. **Plant Physiol. Biochem.** 38 (6), 441-448, 2000.

FELFILI, J. M., *et al.* Changes in the floristic composition of cerrado *sensu strictu* in Brazil over a nine-year period. **Journal of Tropical Ecology** 16:579-590, 2000.

FERNANDES-MATIOLI, F. M. Genealogia e o Processo de Coalescência. In: MATIOLI, S. R. (Ed.) **Biologia Molecular e Conservação**. Ribeirão Preto:Editora Holos, 2001. p.162-171.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP** (Phylogeny Inference Package) version 3.5. Washington. Seattle distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, 1993.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa-Cenargem, 220p, 1998.

FERRI, M. G. **Plantas do Brasil**: espécies do cerrado. São Paulo: Ed. Edgar Blücher Ltda, 1969. P.34-37.

FIDELIS, I.; CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; *et al.* Características anatômicas de estruturas vegetativas de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. desenvolvidas in vitro e in vivo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p. 327-336, 2000.

FILHO, C. F. D. **Morfologia vegetal**. Jaboticabal, FUNEP/UNESP, 1993. 243p.

FILHO, O. K.; SIQUEIRA, J. O. Micorrizas arbusculares da agricultura. In: CARNEIRO, M. A. C. **Microbiologia do solo**. Curso de microbiologia do solo. UFLA, Lavras, MG, 1999. p.103-115.

FORD, Y. Y.; BONHAM, E. C.; CAMERON, R. W. F.; BLAKE, P. S.; *et al.* Adventitious rooting: axamining the role of auxin in easy and a difficult-to-root plant. **Plant Growth Regulation 00**: 1-11, 2001.

FORTUNATO, I. M., *et al.* The effect of mycorrhizal simbiosis on the development of micropropagated artichokes. **Scientia Horticulturae**, v. 106, n.4, 2005, 475-483.

FRANÇA, S. C.; DUARTE, I. B.; MORAES, R; *et al.* Micropropagation of *Stryphnodendrons polyphythum* (Babatimão). In: **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 42: 291-293, 1995.

FRANZOI, C.L.; ANTONINI, G.; BUZZI, F. C. *et al.* Síntese e atividade antinoceptiva de derivados do ácido caféico isolado de rizomas de *Mandevilla illustris* (Apocynaceae). In: VI JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS TECNOLOGIA E SAÚDE, 2003, São Pedro. **Anais...** UNESP, 2003.

FREIRE, M. S.; MORALES, E. A. V.; BATISTA, M. F. Diversidade Genética. In: VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANT'ANA, E. P. **A cultura do arroz no Brasil**. Embrapa Arroz e Feijão, 1999. p.559-581.

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin Metabolism During Adventitious Rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 117-131.

GAUER, L. ; CAVALLI-MOLINA, S. Genetic variation in natural population of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. **Heredity**. 84:647-656.2000.

GE, S.; *et al.* RAPD variation within and between natural populations of wild rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil. **Heredity**: an International Journal of Genetics, v. 82, p.638-644, 1999.

GILLIES, A. C. M. *et al.* Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. **Heredity**: an International Journal of Genetics, v. 83, p.722-732, 1999.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998, v.1, p. 43-76.

GRAZZIOTTI, P. H. Micorrizas. In: CARNEIRO, M. A. C. **Microbiologia do solo**. Curso de microbiologia do solo. UFLA, Lavras, MG, 1999. p.90-102.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.*(Org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 3. ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 2001. p. 13-26.

GUNTER, L.E.; TUSKAN,G.A.; WULLSHLEGER,D. Diversity among population of Switchgrass based on RAPD markers. **Crop Sci.**, 36:1017-1022,1996.

GUPTA, S. K.; KHANUJA, S. P. S.; KUMAR, S. *In vitro* micropropagation of *Lippia alba*. **Current Science**, vol 81, no.2, 2001.

HACKETT, W. P. Donor Plant Maturation and Adventitious Root Formation. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 11-28.

HAISSIG, B. E.; RIEMENSCHNIEDER, D. E. Genetic Effects and Adventitious Rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 47-60.

HASEN, J. Influence of Gibberellins on Adventitious Root. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 162-173.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. B.; FRÁGUAS, C. B. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.2, p.462-467, 2001.

HOEHNE, M. V. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: (s.n.), 1978. P.269-271.

HOVÁRTH, G.; TANTOS, A.; MESZAROS, A.; *et al.* triacontanol-supported micropropagation of woody plants. **Plant Cell Reports** (2001), 20:16-21.

HOYT, E. **Conservação de Parentes silvestres de Plantas Cultivadas**. IBPGR, IUCN, WWF, Embrapa/Cenargem, 1992. 52p.

HUANG, L. C., *et al.* Paphiopedilum cloning *in vitro*. **Scientia Horticulturae** 91 (2001) 111-121.

IBAÑEZ, M. R.; AMO-MARCO, J. B. Promotion by phloroglucinol of micropropagation of *Minuartia valentina* an endangered and endemic apanish plant. **Plant Growth Regulation** 26: 49-56, 1998.

ILAN, A.; ZIV, M.; HALEVY, A. H. Propagation and corm development of Brodiaea in liquid cultures. **Scientia Horticulturae**. vol 63, 101-112, 1995.

ISTITUTO DI RICERCHE SULLA OLIVICULTURA. Effect of medium darkening on *in vitro* rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. **Scientia Horticulturae**. v.97, n.2, 129-139, 2003.

ISUTSA, D. K. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora adulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae**. 99 (2004) 395-400.

JAIN, N.; *et al.* Molecular diversity in *Phyllanthus amarus* assessed through RAPD analysis. **Current Science**, v. 85, n.10, p.1454-1458, 2003.

JAMES, D. J.; KHIGHT, V. H.; THURBON, I. J. Micropropagation of red raspberry and the influence of phoroglucinol. **Scientia Horticulturae** 12 (1980) 313-319.

JARVIS, B. C.; *et al.*, Differential control of lenght and number in adventitious roots of mung bean. **Scientia Horticulturae** 25: (2) 1985, 111-116.

JOSHEE, N.; BASTOLA, D. R.; AGRAWAL, V. P.; YADAV, A. K. Lakoocha: a multipurpose tree of warm climate. **Trends in new crops and new uses**. ASHS Press, 405-407, 2002.

JOSHI, M.; DHAR, U. In vitro propagation of *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. – an endangered ethnoreligious medicinal herb of Himalaya. **Plant Cell Reports**. 201-208, 2003.

JOSTEN, P.; KUTSCHERA, U. The micronutrient boron causes the development of adventitious roots in sunflower cuttings. **Annals of Botany**. 84:337-342, 1999.

KADOTA, M.; NIIMI, Y. Improvement of micropropagation of Japanese yam using liquid and gelled medium culture. **Scientia Horticulturae**. 102. (2004) 461-466.

KAPTEYN, J.; SIMON, J. E. The use of RAPD for assessment of identity, diversity, and quality of *Echinacea*. **Trends in new crops and new uses**. P.509-513, 2002.

KATAOKA, I.; INOUE, H. Micropropagation of Java apple (*Eugenia javanica* Lam.). **Jpn. J. Trop. Agr.** 37(3): 209-213, 1993.

KLEIN, A. L. **Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois**. São Paulo: Editora Unesp; Imprensa Oficial do Estado, 2002. 156p.

KOCH, I.; KINOSHITA, L. S. As Apocynaceae S. STR da região de Bauru, São Paulo, Brasil. **Acta Bot Bras** 13(1): 61-86, 1999.

KOTSIAS, D.; ROUSSOS, P. A. Investigation on the effect of different plant growth regulating compounds in in vitro shoot tip and node culture of lemon seedlings. **Scientia Horticulturae**. 89 (2001) 115-128.

KUMAR, V.; *et al.* Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of *Capsicum annuum* L. **Scientia Horticulturae** (106) 2: 2005, 237-246.

LAMBAIS, M. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo-planta em micorrizas arbusculares. In: SIQUEIRA, J. O. **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras/DCS e DCF, 1996. p. 5-38.

LATA, A. H. In vitro conservation of tropical plant germoplasma, a review. *Euphytica*, Netherlands journal of plant breeding, **Mississippi**. v. 57, p. 227 - 243, 1991.

LEE, T.; HUANG, M. E. E.; PUA, E. High frequency shoot regeneration from leaf disc explants of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.) *in vitro*. **Plant Science** 126 (1997) 219-226.

LEITE, G. B.; FINARDI, N.; FORTES, G. R. L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de pereira OH X F97. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.2, p.353-357, 2000.

LEONARDI, C.; RUGGERI, A.; MALFA, L. S. Hormone effects on in vitro proliferation and rooting of *Grevillea* explants. **Scientia Horticulturae**. 90 (2001) 335-341.

LI, X.; CHRISTIE, P. Changes in soil solution Zn and pH and uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal red clover in Zn-contaminated soil. **Chemosphere** (2001), 201-206.

LIMA, C. C. M. **Uso de aditivos e cofatores na rizogênese de plântulas de *Eucalyptus grandis* Hill. *in vitro***. 1998. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciências florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

LIMA, E. C. **Indução e enraizamento *in vitro* de brotações em segmentos nodais de sangra d’água**. 2004. 71p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

LIU, W. CHILCOTT, C. E.; REICH, R. C.; HELLMANN, G. M. Regeneration of *Salvia sclarea* via organogenesis. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant** **36**: 201-206, 2000.

LOACH, K. Water Relations and Adventitious Rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 102-116.

LOCATELLI, L. M.; LOVATO, P. E. Inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de macieira micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.2, 2002.

LOCATELLI, L. M.; VITOVSKI, C. A.; LOVATO, P. E. Sistema radicular de porta-enxertos micropropagados de macieira colonizados com fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.9, 2002.

LOPES, S. C.; LAMEIRA, O. A.; FORTES, G. R.; *et al.* Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne**, v.7, n.1, p.124-128, 2001.

LOVELESS, M. D.; HAMRICH, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review and Systematics**, v.15, p.65-95, 1984.

LU, M. Micropropagation of *Morus latifolia* Poilet using axillary buds from mature trees. **Scientia Horticulturae** 96 (2002) 329-341.

LYNCH, M. MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**. v. 3, p.91-99, 1994.

MACKAY, W. A.; TIPTON, J. L.; THOMPSON, G. A. Micropropagation of Mexican redbud *Cercis canadensis* var *mexicana*. **Plant Cell and Organ Culture** **42**: 295-299, 1995.

MAJADA, J. P.; TAMÉZ-SÁNCHEZ, R.; REVILLA, M. A.; CASARES, A. Micropropagation of *Ilex aquifolium* L. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant** **36**: 521-526, 2000.

MANICKAM, V. S.; MATHAVAN, R. E.; ANTONISAMY, R. Regeneration of Indian ginseng plantlets from stem callus. **Plant Cell and Organ Culture** **26**: 181-185, 2000.

MARTIN, K. Parid in vitro multiplication and ex vitro rooting of *Rotula aquatica* Lour.; a rare rhoeophytic woody medicinal plant. **Plant Cell Reports**. Vol 21, n. 5, 415-420, 2003.

MAYNARD, B. K.; BASSUK, N. L. Etiolation and Banding Effects on adventitious root formation. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 29-46.

MCCOWN, B. H. Adventitious Rooting of Tissue Cultured Plants. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 289-302.

MENDONÇA, M. P.; LINS, L. V. **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte: fundação Biodiversitas, fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, 2000. 160p.

MENDONÇA, R. C.; ELINI, J. M.; WALTER, B. M. T. Flora Vascular do Cerrado. In SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado, ambiente e flora**. Planaltina: embrapa/CPAC, 1998.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** 5:14-17, 1998.

MILLER, M. P. **TFPGA 1.03**: Tools for populations genetics analyses (Programa para computador livre distribuído pelo autor) Disponível em <<http://www.marksgeneticssoftware.net/tfpga.htm>>. Acesso em fevereiro de 2005.

MILLER, M. P. **AMOVA-PREP 1.01**: A program for preparation of AMOVA input from dominant-marker of raw data (Programa para computador livre distribuído pelo autor) Disponível em <<http://www.marksgeneticssoftware.net/amovaprep.htm>>. Acesso em fevereiro de 2005.

MIRANDA, J. C. C.; MIRANDA, L. N. Micorriza arbuscular. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos do cerrado**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997, p. 67-123.

MIRANDA, J. C. C., MIRANDA, L. N. Manejo da Micorriza Arbuscular por meio de Rotação de Culturas. **Recomendação Técnica**, Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, n.27, 2001, 2p.

MIRANDA, J. C. C., MIRANDA, L. N. Contribuição da Micorriza Arbuscular na Resposta das culturas à Calagem e Adubação Fosfatada em Solos de Cerrado. **Comunicado Técnico**, Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, n.89, 2003, 3p.

MODGIL, M.; SHARMA, D. R.; BHARDAY, S. V. Micropropagation of apple cv. Tydemán's Early Worcester. **Scientia Horticulturae** 81 (1999) 179-188.

MORAES, R. M. *et al.* Arbuscular mycorrhiza improves acclimatization and increase lignan content of micropropagated mayapple (*Podophyllum peltatum* L.). **Plant Science**, 166 (2004), 23-29.

MORAIS, R. G.; JORGE, S. S. A.; NETO, G. G. Pesquisas regionais com informações sobre plantas medicinais: a diversidade biológica e sócio-cultural de Mato Grosso em foco. In: COELHO, M. F. B.; JÚNIO, P. C.; DOMBROSKI, J. L. D. Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais : **anais do I Seminário Mato-grossense de Etnobiologia e Etnoecologia e II Seminário Centro-Oeste de Plantas Medicinais**. Cuiabá: Unicen, 2003. 250p.

MORÁN, G. P.; COLQUE, R.; VILADOMAT, F.; *et al.* Mass propagation of *Cyrtanthus cavatus* and *Cyrtanthus spiralis* using liquid medium culture. **Scientia Horticulturae** 98 (2003) 49-60.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Ed. UFLA – Lavras, MG, 2002, 621p.

MOURA, E. F. **Divergência genética entre acessos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*)**. 2003. 75p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MURASHIGE, T. SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.1, p.437-496, 1962.

MURINA, M. A.; *et al.* Chemiluminescence in a stimulated polymorphonuclear leukocytes – Luminol system: suppression by thiols. **Biofizika** 50 (6): 1100-1104, 2005.

NAGORI, R.; PUROHIT, S. D. In vitro plantlet regeneration in *Annona squamosa* through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments. Short communication. **Scientia Horticulturae**. 99 (2004) 89-98.

NADEEM, M.; PALNI, L. M. S.; PUROHIT, A. N. *et al.* Prpagation and conservation of *Podophyllum hexandrum* Royle: as important medicinal herb. **Biological conservation**. 92 (2000) 121-129.

NAIK, S. K.; CHAND, P. K. Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine promote *in vitro* adventitious shoot regeneration of pomegranate (*Punica grNAAtum* L.). **Journal of Plant physiology**. Vol. 160, n. 4, 2003, 423-430.

NARENDRA, S.; UPADHYAYA, A. Polyamines and Adventitious Root Formation. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 202-213.

NASS, L.L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L. *et al.* **Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 31-55.

NEGASH, A.; PUIITE, K.; SCHAART, J.; *et al.* *In vitro* regeneration and micropropagation of enset from Southwestern Ethiopia. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** **62**: 153-158, 2000.

NEGUSSIE, A. *In vitro* induction of multiple buds in tissue culture of *Jeniperus excelsa*. **Forest Ecology and Management** **98** (1997) 115-123.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.70, n.12, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, p.583-590, 1978. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.70, n.12, p. 3321-3323, 1973.

NETO, G. G.; MORAIS, R. G. Recursos Medicinais de espécies do cerrado do Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta bot. Bras.** **17(4)**: 561-584, 2001.

NEVES, C. *et al.* Involvement of free and conjugated polyamines and free amino acids in the adventitious rooting of micropropagated cork oak and grapevine shoots. **Plant Physiol. Biochem.** **40** (2002), 1071-1080.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n.1, p. 84-90, 2003.

NIERO, R.; ALVES, R. V.; FILHO, V. C.; *et al.* A New anti-oedematogenic nor-pregnane derivative isolated from *Mandevilla illustris*. **Planta Med**, 2002, 68:847-850.

NÓBREGA, J. C. A. *et al.* Fosfato e micorriza na estabilidade de agregados em amostras de latossolos cultivados e não cultivados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.11, p.1425-1435, 2001.

NODOYE, M.; DIALLO, I.; GASSAMA, Y. K. *In vitro* multiplication of the semi-arid forest tree, *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. **African Journal of Biotechnology** vol. 2 (11), 421-4242, 2003.

ODUM, E. P. Ecologia. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1998, p.258-266.

OLIVEIRA, A. F.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. B.; *et al.* Enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira sob o efeito de diferentes épocas, substratos e concentrações de ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.1, p.117-125, 2003.

ONAY, A. Micropropagation of Pistachio from mature trees. **Plant Cell and Organ Culture** 60: 159-162, 2000.

ONO, E. O. **Efeitos de reguladores de crescimento e ácido bórico no enraizamento de estacas caulinares de algumas variedades de kiwi (*Actinidia chinensis* Pl.)**. Tese (Doutorado em Ciência Biológicas/Botânica). 1994. 249p. Botucatu-SP.

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 83p.

PALANISAMYA, K.; KUMARA, P. Effect of position, size of cuttings and environmental factors on adventitious rooting in neem (*Azadirachta indica*). **Forestry Ecology and Management**, v.98, n.3, p.277-280, 1998.

PANAIA, M. SENARATNA, T.; BUNN, E.; *et al.* Micropropagation of the critically endangered Western Australian species, *Symonanthus bancroftii* (F. Muell.) L. Haegi (Solanaceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture** **63**: 23-29, 2000.

PARKER, P. G.; *et al.* What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v.79, n.15, p.361-382, 1998.

PASQUAL, M. **Cultura de Tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.

PATTANAYAK, D.; CHAKRABARTI, S. K.; NAIK, P. S. Genetic diversity of late blight resistant and susceptible Indian potato cultivars revealed by RAPD markers. **Euphytica: Netherlands Journal of Plant Breeding**, v.128, p.183-189, 2002.

PEREIRA, A.M. S. P.; AMUI, S. F.; BERTONI, B. W.; *et al.* Micropropagation of *Anemopaegma arvense*: Conservation of an Endangered Medicinal Plant. In: **Planta Medica – Natural Products and Medicinal Plant Research**. 2003; 69: 571-573. New York – NY.

PEREIRA, A. M. S.; BERTONI, B. W.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; *et al.* Micropropagation of *Pothomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. **Plant Cell and Organ Culture** **60**: 47-53, 2000.

PEREIRA, E. G., *et al.* Efeitos da micorriza e do suprimento de fósforo na atividade enzimática e na resposta de espécies arbóreas ao nitrogênio. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, 8(1):59-65, 1996.

PEREIRA, F. D.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. G.; LAMEIRA, O. A. Propagação *in vitro* de chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* RATAJ.), uma planta medicinal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24. (Edição Especial), p. 74-80, 2000.

PIERIK, R. L. M.; OOSTERKAMP, J.; EBBING, M. A. C. Factors controlling adventitious root formation of explants from juvenile and adult *Quercus robur* 'Fastigiata'. **Scientia Horticulturae**. 71 (1997) 87-92.

PINHEIRO, J. B.; *et al.* Diversidade genética molecular em acessos de açafrão utilizando marcadores RAPD. **Acta Scientiarum**, v.25, n.1, p.195-199, 2003.

PINTO, A. C.; *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, vol. 25, supl. 1, 45-61, 2002.

PINTO, J. E. B.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.

PINTO, S. I. C.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia Forestalis**, n. 65, p.40-48, 2004.

PIOLA, F.; ROHR, R.; HEIZMANN, P. Rapid detection of genetic variation within and among *in vitro* propagated cedar (*Cedrus libani* Loudon) clones. **Plant Science** 141: 159-163, 1999.

PIRES, M. O. Cerrado: sociedade e biodiversidade. In: IORIS, E. Plantas Medicinais do Cerrado: Perspectivas Comunitárias para a Saúde, o meio Ambiente e o Meio Sustentável. **Anais do Workshop Plantas Medicinais do Cerrado**. Mineiros: GO, 1999. 260p.

POLANCO, M. C.; RUIZ, M. L. Factors that effects plant regeneration from *in vitro* culture of immature seeds in four lentil cultivars. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 66: 133-139, 2001.

PRETO, F. R.; SANTERM, E. R. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 62: 107-113, 2000.

PROENÇA, C.; OLIVEIRA, R. S.; SILVA, A. P. **Flores e frutos do cerrado = flowers and fruits of the cerrado**. Brasília: Editora Universidade de Brasília; São Paulo: Imprensa Oficial do Estado, 2000. 226p.

POUYÚ-ROJAS, E., SIQUEIRA, J. O. Micorriza arbuscular e fertilização do solo no desenvolvimento pós-transplante de mudas de sete espécies florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.35, n.1, p.103-114, 2000.

QUORIN, M.; SILVA, M. C. MARTINS, K. G.; OLIVEIRA, D. E. Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** **66**: 199-205, 2001.

RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, SP. V.24, n.3, p. 157-163, 2002.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany** **80**: 223-230, 1997.

REDDY, P. S.; RODRIGUES, R.; RAJASEKHARAN, R. Shoot organogenesis and mass propagation of *Coleus forskohlii* from leaf derived callus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** **66**: 183-188, 2001.

REIS, M. S.; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* Org. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 3. ed. rev. - Porto Alegre/Florianópolis : Ed. Universidade/UFRGS/Ed. UFSC, 2001. p. 41-62.

RIBAS, L. A.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética em uma população de *Trema micrantha* (L.) B. considerando diferentes estádios de vida. **Scientia Forestalis**, n. 65, p.176-187, 2004.

RIBEIRO, J. F. **Cerrado: matas de galeria**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 164p.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado: ambiente e flora. Planaltina**: EMBRAPA-CPAC, 1998, 556p.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. **Plantas Medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 180p.

ROGALSKI, M.; MORAES, L. K. A.; FELISBINO, C. *et al.* Enraizamento *in vitro* de porta-enxerto de *Prunus*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, SP. V.25, n.2, p. 293-296, 2003.

ROLF, F. J. NTSYS-Pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Ver. 1.6. Exeter Software, Setauked, NY, 1990.

ROTUNDO, J. C. **Efeitos de concentrações de nitrato de amônio na multiplicação e no enraizamento *in vitro* de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell e *Eucalyptus citriodora* Hook.** 1993. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

ROUSE-MILLER, J.; DUNCAN, J. E. *In vitro* propagation of *Artocarpus altipis* (PARK.) FOSBERG (BREADFRUIT) from mature plant material. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant** 36: 115-117, 2000.

ROUSSOS, P. A.; PONTIKIS, C. A.; TSANTILI, E. Root promoting compounds detected in olive knot extract in high quantities as a response to infection by the bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. **Plant Science** 163, 533-541, 2002.

ROUSTAN, J.P.; LATCHA, A.; FALLOT, J. Control of carrot somatic embryogenesis by AgNO₃ as inhibitor of ethylene action: Effect on arginine decarboxylase activity. **Plant Science** (67) 1: 1990, 89-95.

ROUT, G. R.; DAS, P.; GOEL, S.; RAINA, S. N. Determination of genetic stability micropropagated plant of ginger using Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, 39: 23-27, 1998.

RUSSELL, J. R.; *et al.* Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao*) populations revealed by RAPD analysis. **Molecular Ecology**. V.2, p.89-97, 1993.

SALES, E.; S. G. NEBAUER; M. MUS; J. SEGURA, 2001. Population genetic study in the Balearic endemic plant species *Digitalis minor* (Scrophulariaceae) using RAPD markers. **American Journal of Botany** 88(10): 1750-1759, 2001.

SANDES, A. R. R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade Química e genética. In: **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlandia, Ano 2, n. 13, p. 28-32, 2000.

SANKHLA, A.; UPADHYAYA, A. Polyamines and adventitious root formation. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 289-302.

SANTOS, I. P. A., *et al.* Influência do Fósforo, Micorriza e Nitrogênio no Conteúdo de Minerais de *Brachiaria brizantha* e *Arachis pinto*i Consorciados. **R. Bras. Zootec.**, v. 31, n.2, p.605-616, 2002.

SANTOS, I. P. A., *et al.* Resposta a fósforo, micorriza e nitrogênio de braquiário e amendoim forrageiro consorciados. Rendimento de matéria seca da parte aérea e da raiz. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.5, p.1206-1215, 2001.

SARKAR D.; NAIK, P. S. Phloroglucinol enhances growth and rate of auxillary shoot proliferation in potato shoot tip cultures *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 60: 139-149, 2000.

SARMA, K. S.; ROGERS, S. M. D. Plant regeneration from seedling explant of *Juncus effusus*. **Aquatic Botany** 68 (2000) 239-247.

SHARMA, A. R.; TRIGIANO, R. N.; WITTE, W. T.; SCHWARZ, O. J. In vitro adventitious rooting of *Cornus florida* microshoots. Short communication. **Scientia Horticulturae**. 103 (2005) 381-385.

SHARMA, K. K.; THORPE, T. A. In vitro propagation of mulberry (*Morus alba*) through nodal segments. **Scientia Horticulturae** 42 (1990) 307-320.

SHIBLI, R. A.; *et al.* Micropropagation in wild pear (*Pyrus syriaca*). **Scientia Horticulturae** 68 (1997) 237-242.

SILVA, L. S.; *et al.* **Banco de germoplasma de espécies florestais nativas Dom campo experimental Sucupira**. Brasília:Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001, 46p.

SILVA, S. R. Plantas do Cerrado utilizadas pelas comunidades do Grande Sertão Veredas. Brasília:fundação Pró-Natureza- FUNATURA, 1998. 109p.

SILVA-JÚNIOR, J. P., SIQUEIRA, J. O. Aplicação de formononetina sintética ao solo como estimulante da formação de micorriza no milho e na soja. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, 9(1):33-39, 1997.

SIQUEIRA, J. O. **Biotecnologia do solo: Fundamentos e perspectivas**. ESAL/FAEPE, Lavras, MG, 1988.

SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e micorrizologia. In: SIQUEIRA, J. O. **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras/DCS e DCF, 1996. p. 1-4.

SIQUEIRA, J. O.; LAMBAIS, M. R.; STÜRMER, S. L. Fungos micorrízicos arbusculares. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 25, 12-21, 2002.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. (Ed.) **Biologia Molecular e conservação**. Ribeirão Preto:Editora Holos, 2001. p.172-192.

SOLFERINI, V. N.; SELIVON, D. Polimorfismos de isoenzimas. In: MATIOLI, S. R. (Ed.) **Biologia Molecular e conservação**. Ribeirão Preto:Editora Holos, 2001. p.139-142.

SOUZA, A.V. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica (*Lychnophora pinaster*) MART.** 2003. 127p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOUZA, A.V.; *et al.* Enraizamento *in vitro* de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.), uma planta medicinal. **Revista Brasileira de plantas Medicinais**, Botucatu, v.7, n.1, p.86-91, 2004.

SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae). **Scientia Forestalis**, n. 65, p.70-79, 2004.

SOUZA, R. F., *et al.* Influência de micorriza e fósforo sobre o rendimento de matéria seca e qualidade de *Andropogon gayanus* e *Stylosanthes guianensis* cultivados em um latossolo. **Pastura Tropicales**, v. 22, n. 2, p. 34-41, 2002.

SOUZA, R. F., *et al.* Micorriza e fósforo no crescimento de *Andropogon gayanus* e *Stylosanthes guianensis* cultivados sob condições de estresse hídrico em um latossolo vermelho escuro distrófico. **Pastura Tropicales**, v. 22, n. 2, p. 42-46, 2002.

SREEKUMAR, S.; SEENI, S.; PUSHPANGADAN, P. Micropropagation of *Hemidescus indicus* for cultivation and production of 2-hydroxy 4-methoxy benzaldehyde. **Plant Cell and Organ Culture** **62**: 211-218, 2000.

STADEN, J. V.; HARTY, A. R. Cytokinins and Adventitious Root Formation. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 185-201.

STRACK, D., *et al.* Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical and molecular aspects. **Chem Ecol.** 29 (9), 2003, 1955-1979.

SYROS, T.; YUPSANIS, T.; ZAFIRIADIS, Z.; *et al.*, Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenuns cretica* L. **Journal of plant physiology.** 161. 69-77 (2004).

TANG, W.; NEWTON, R. J. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). **Plant Science**, 167 (3): 621-628, 2004.

TANTOS, A.; MESZAROS, A.; FARKAS, T.; SZALAI, J. Triacontanol-supported micropropagation of woody plants. **Plant Cell Reports** (2001) 20:16-21.

TAWFIK, A. A.; NOGA, G. Adventitious shoot proliferation from hypocotyl and internodal stem axplant of cumin. **Plant Cell and Organ Culture** **66**: 141-147, 2001.

TCHIGIO, I.; DUGUMA, B. Vegetative propagation of *Calliandra calothyrsus* (Meissner). **Agroforestry System** **40**: 275-281, 1998.

TCHOUNDJEU, Z.; MPECK NGO, M. L.; ASSAH, E.; AMOUGOU, A. The role of vegetative propagation in the somestication of *Pausinystalia johimbe* (K. Scum), a highly threatened

medicinal species of West and Central Africa. **Forest Ecology and Management**. 188 (2004) 175-183.

TELES, M. P. C. **Diversidade genética e estrutura populacional de cagaitera (*Eugenia dysenterica* DC.) do sudeste de Goiás**. 2000. 129p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Univeridade Federal de Goiás, Goiânia.

TELLES, M. P. DE C.; *et al.* Autocorrelação espacial das frequências alélicas em subpopulações de cagaitera (*Eugenia dysenterica* DC., Myrtaceae) no sudeste de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**. V. 24, n.2, p.145-154, 2001a.

TELLES, M. P. DE C.; *et al.* Divergência entre subpopulações de cagaitera (*Eugenia dysenterica*) em resposta a padrões edáficos e distribuição espacial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n.11, p.1387-1394, 2001b.

TIWARI, V.; TIWARI, K. N.; SINGH, B. D. Comparative studies os citokynis on *in vitro* propagation of *Bacopa monniera*. **Plant Cell and Organ Culture** **66**: 9-16, 2001.

VASAR, V.; SVENSSON, M. Effects antioxidants on root formation and morphology of micropropagated prunus avium. **New Phytologist**, 2005, p 773-781.

VENGADESAN, G.; GANAPATHI, A.; PREM ANAND, R.; RAMESH ANBAZHAGAN, V. **Plant Cell and Organ Culture** **61**: 23-28, 2000.

VEIERSKOV, B. Relations Between Carbohydrates and Adventitious Root Formation. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland – Oregon, 1988, v.2, p. 70-78.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência de Desenvolvimento**. 3 (14) 2000. p.18-20.

VIEIRA, R. F. Importância da variabilidade genética para produção de metabólitos secundários. In: CAVALCANTI, T. B.; *et al.* **Tópicos Atuais em Botânica**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 304-307, 2000.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Recursos Genéticos e Plantas Medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu, v. 3, n. 1, p.13-36, 2000.

VIEIRA, R. F.; ALVES, R. B. N. Desafios para a conservação de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas no Brasil. In: COELHO, M. F. B.; JÚNIO, P. C.; DOMBROSKI, J. L. D. Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais : **anais do I Seminário Mato-grossense de Etnobiologia e Etnoecologia e II Seminário Centro-Oeste de Plantas Medicinais**. Cuiabá: Unicen, 2003. p. 121-136.

VILLALOBOS, V. M.; ENGELMANN, F. Ex situ conservation of plant germoplasm using biotechnology. *Word Jornal of Microbiology& Biotecnology*. v. 11, p. 375 - 382, 1995.

WANG, Q. Factors affecting rooting of microcuttings of the pear rootstock BP10030. **Scientia Horticulturae** 45 (1991) 209-213.

WALLNER, E.; *et al.* Oligonucleotide fingerprinting and RAPD analysis of *Achillea* species: characterization and lonterm monitoring of micropropagated clones. **Plant Cell Reports** 15:647-652, 1996.

WEIR, B. S. **Genetic Data Analysis II**. Sunderland, Massachussets:Sinauer Associates, 1996.

WILLIAMS, J. G. K.; *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. **Nucleic Acid Res** 18, 6531-6535, 1990.

WHITE, P. R. Vitamin B₁ in the nutrition of excised tomato roots. **Plant physiology**, v.12, p.803-811, 1937.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de Recursos Genéticos de Plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SP/Embrapa-CNPH. v. 1, p. 297 - 330, 1998.

XIE, D.; HONG, Y. *In vitro* regeneration of *Acacia mangium* via organogenesis. **Plant Cell and Organ Culture** **66**: 167-173, 2001.

YAP, I. V.; NELSON, R. J. Winboot: A programa for performing bootstrap analysis os binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendograms, **IRRI discussion paper** n.14, 22p, 1996.

YEPES, L. M.; ALDWINCKLE, H. S. Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and affect of antibiotics on proliferation. **Plant Growth Regulation** **15**: 55-67, 1994.

YUNES, R. A.; BRUM, R. L.; CALIXTO, J. B.; *et al.* Illustrol, a seco-norpregnane derivative from *Mandevilla illustris*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 3, p.787-790, 1993.

ZANGARO, W. *et al.* Micorriza arbuscular em espécies arbóreas nativas da bacia do rio Tibagi, Paraná. **Cerne**, v.8, n.1, 77-87, 2002.

ZIMBACK, L.; *et al.* Estrutura genética de populações de *Trichillia pallida* Swarts (Meliaceae) por marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**, n. 65, p.114-119, 2004.

APÊNDICE

APÊNDICE 1. Espécies medicinais do cerrado e seus respectivos usos

ESPÉCIE	USO MEDICINAL
<i>Anacardium humile</i>	Inflamação ovariana, anti-diarréico, béquico,
<i>Anadenanthera falcata</i>	Bronquite
<i>Andira humilis</i>	Vermífugo
<i>Anemopaegma arvense</i>	Afrodisíaco, sistema nervoso, estimulante
<i>Annona crassiflora</i>	Anti-diarréico
<i>Aristolochia cymbifera</i>	Reumatismo
<i>Baccharis trimera</i>	Tônico, febrífugo, fígado, eu péptico
<i>Barjonia cymosa</i>	Afrodisíaco
<i>Bauhinia rufa</i>	Anti-reumático, anti-hemorragico, inchaço
<i>Borreria verbenoides</i>	Sinusite, hemorragia, barriga grande
<i>Bowdichia virgilioides</i>	Anti-febrífugo, dores reumáticas, diabete, febre, depurativo
<i>Brosimum gaudichaudii</i>	Vitiligo, depurativo do sangue
<i>Byrsonima verbascifolia</i>	Depurativo do sangue
<i>Calliandra dysantha</i>	Regulador menstrual
<i>Caryocar brasiliensi</i>	Afrodisíaco
<i>Casearia sylvestris</i>	Cicatrizante, febre, reumatismo
<i>Cecropia pachystachya</i>	Expectorante
<i>Cordia verbenacea</i>	Béquico, dor reumática, febrífugo, problema de coluna
<i>Copaifera langsdorffii</i>	Resfriado, dor de gargante, antiinflamatório, cicatrizante
<i>Croton antisiphiliticus</i>	Anti-sifilítico, reumatismo, antiinflamatório, inchaço
<i>Dimorphandra mollis</i>	Anti-hemorragico
<i>Dipteryx alata</i>	Reumatismo
<i>Enterolobium ellipticum</i>	Anti-séptico
<i>Erytroxylum campestre</i>	Adstringente, purgativo
<i>Eugenia dysenterica</i>	Anti-diarréico, cicatrizante, disentérico

<i>Gomphrena officinalis</i>	Febre, asma, bronquite, picada de cobra
<i>Hancornia speciosa</i>	Caimbras, problema pulmonar
<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	Cistite, laxante, vermífugo, sinusite, anti-inflamatório
<i>Inga alba</i>	Laxativo
<i>Jacaranda decurrens</i>	Infecções, reumatismo
<i>Jatropha elliptica</i>	Anti-reumático
<i>Kielmeyera coriacea</i>	Emoliente, irritação nos olhos, vermífugo, disenteria
<i>Lychnophora ericoides</i>	Anti-inflamatório, cicatrizante
<i>Machaerium opacum</i>	Vermífugo, dor de dente
<i>Macrosiphonia velame</i>	Anti-reumático, depurativo, anti-sifilítico, feridas, úlcera
<i>Mandevilla velutina</i>	Antiofídico, depurativo do sangue
<i>Ocotea pretiosa</i>	Depurativo, diurético, reumatismo, anti-sifilítico
<i>Palicourea rigida</i>	diurético, calmante, problemas renais, dores nos rins
<i>Periandra mediterranea</i>	Gripe, tosse, expectorante
<i>Potomorphe umbelata</i>	Problema hepático
<i>Psidium firmum</i>	Adstringente
<i>Pterodon pubences</i>	Inflamação da garganta, calmante, antiinflamatório
<i>Rudgea viburnoides</i>	Anti-sifilítico, anti-diarréico, anemia, anti-reumático
<i>Senna rugosa</i>	Vermífugo, picada de cobra
<i>Smilax goyazana</i>	Gonorréia, reumatismo, eczema, depurativo
<i>Solanum aff. Lycocarpum</i>	Bronquite, gripe, estomacal, calmante, problemas de fígado
<i>Strychnos pseudoquina</i>	Malária, febre, afrodisíaco, cicatrizante, fígado
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Anti-séptico, cicatrizante
<i>Tabebuia aurea</i>	Expectorante
<i>Tabebuia ochracea</i>	Diurético, hepatite, anemia, dores nos rins, anti-sifilítico
<i>Vellozia squamata</i>	Anti-reumático, problemas nos rins, dores de coluna
<i>Vernonia ferruginea</i>	Bronquite, pneumonia, febre, contusões
<i>Vochysia rufa</i>	Anti-diarréico, resfriado, vermífugo
<i>Zeyheria montana</i>	Anti-sifilítico

