

**Universidade de Brasília**

**Instituto de Ciências Biológicas**

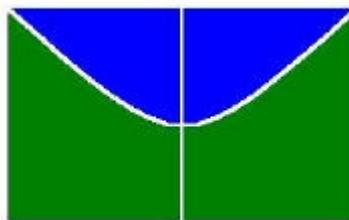
**Departamento de Botânica**

**Micropropagação e anatomia foliar de Canela - de - Ema  
(*Vellozia flavicans* Mart. ex Schult f. - Velloziaceae)  
em diferentes condições ambientais**

**Olegário Garcia de Freitas Neto**

**Brasília, DF**

**2009**



**Universidade de Brasília**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Departamento de Botânica**

**Micropropagação e anatomia foliar de Canela - de - Ema  
(*Vellozia flavicans* Mart. ex Schult f. - Velloziaceae)  
em diferentes condições ambientais**

**Olegário Garcia de Freitas Neto**

**Orientadora: Conceição Eneida dos Santos Silveira**

*Co-orientadora: Sueli Maria Gomes*

Dissertação apresentada ao Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Brasília, DF

Abril de 2009

**Membros da banca examinadora:**

---

**Dra. Conceição Eneida dos Santos Silveira**  
Departamento de Botânica, UnB  
Presidente

---

**Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira**  
Cenargen/Embrapa  
Membro titular

---

**Dra. Lourdes Isabel Velho do Amaral**  
Departamento de Botânica, UnB  
Membro titular

---

**Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira**  
Departamento de Botânica, UnB  
Suplente

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meu filho e minha companheira por todo o carinho e compreensão que me ajudaram a vencer todos os momentos difíceis.

A minha orientadora, professora Eneida, pelos ensinamentos, paciência e, principalmente por me receber de braços abertos como seu orientado quando achei que tudo estava perdido.

A minha co-orientadora, professora Sueli, pelos ensinamentos, paciência e por me despertar o interesse pela Anatomia Vegetal.

Ao professor, João Batista Teixeira, pela sua paciência, dedicação e por ter me propiciado os primeiros conhecimentos na área de Cultura de Tecidos Vegetais.

A professora Lourdes Amaral, por me ensinar Fisiologia Vegetal através de uma visão holística que mudou a minha maneira de pensar.

A professora Lúcia Helena, por viabilizar o meu sonho de continuar trabalhando com Cultura de Tecidos Vegetais.

Ao professor Luiz Alfredo, pelo estímulo ao estudo da Anatomia Vegetal.

Ao professor Jonny Everson, pelas valiosas sugestões que contribuíram na elaboração deste trabalho.

Aos professores do Mestrado em Botânica, minha gratidão e reconhecimento.

Aos meus amigos Davi e Getúlio pela ajuda e companheirismo.

Aos amigos do programa de Pós-Graduação em Botânica, Joyce, Wellington e Bruna pelo companheirismo.

Aos funcionários do Departamento de Botânica, Elias, Daiane, Eli, Marinho e Mendes pela ajuda e amizade.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	i
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	v
<b>1 - INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 - Velloziaceae.....	3
2.2 - <i>Vellozia flavicans</i> Mart. ex Schult. f.....	4
2.3 - Importância Econômica.....	6
2.4 - Cultura de tecidos.....	6
2.5 - Meio de cultura.....	7
2.6 - Micropropagação.....	8
2.7 - Alongamento.....	9
2.8 - Estudo anatômico.....	12
<b>3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	14
<b>CAPÍTULO I</b> .....	22
<b>Micropropagação de canela-de-ema (<i>Vellozia flavicans</i> Mart. ex Schult. f.)</b> .....	22
<b>RESUMO</b> .....	23
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	25
<b>2 - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
2.1 - Coleta e conservação do material vegetal.....	26
2.2 - Desinfestação e condições de inoculação de sementes.....	26
2.3 - Germinação <i>in vitro</i> .....	27
2.3.1 - Diferentes temperaturas e presença ou ausência de sacarose na germinação de sementes armazenadas.....	27
2.3.2 - Concentração de sacarose para o estabelecimento de plantas <i>in vitro</i> a partir de sementes recém coletadas.....	27
2.4 - Multiplicação.....	29
2.5 - Alongamento.....	30
2.6 - Enraizamento <i>ex vitro</i> e Aclimatização.....	30

2.7 - Aclimação em viveiro.....	31
2.8 - Análise anatômica.....	31
2.9 - Análise estatística.....	30
<b>3 - RESULTADOS</b>	32
3.1 - Germinação.....	32
3.2 - Multiplicação e subcultivos.....	36
3.3 - Alongamento.....	41
3.4 - Enraizamento <i>ex vitro</i> , aclimatização e aclimação.....	42
<b>4 - DISCUSSÃO</b>	46
4.1 - Restrições à propagação e cultivo por métodos convencionais de Velloziaceae.	46
4.2 - Germinação.....	48
4.3 - Multiplicação.....	49
4.4 - Alongamento.....	51
4.5 - Enraizamento e aclimatização.....	52
<b>5 - CONCLUSÕES</b> .....	53
<b>6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54
<b>7 - ANEXOS</b> .....	58
<b>CAPÍTULO II</b>	61
<b>Anatomia foliar de plantas de canela-de-ema (<i>Vellozia flavicans</i> Mart. ex Schult. f.) em diferentes condições ambientais</b> .....	61
<b>RESUMO</b> .....	62
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	63
<b>2 - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	63
<b>3 - RESULTADOS</b> .....	65
<b>4 - DISCUSSÃO</b> .....	67
<b>5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	69

## ÍNDICE DE TABELAS

### CAPÍTULO I

#### MATERIAL E MÉTODOS

**Tabela 1.** Diferentes tratamentos dispostos em fatorial 3x3x3 na multiplicação de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f..... 29

**Tabela 2.** Diferentes tratamentos no alongamento dos brotos de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f..... 30

#### RESULTADOS

**Tabela 3.** Germinabilidade (%) de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. armazenadas por 6 meses a 8 °C e cultivadas em meio com ou sem sacarose e sob diferentes temperaturas. Observações efetuadas no 18<sup>o</sup> dia de cultivo *in vitro*..... 33

**Tabela 4.** Germinabilidade (%) e massa fresca de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. recém coletadas e inoculadas em meio MS com diferentes concentrações de sacarose a 27±2 °C..... 34

**Tabela 5.** Número de brotos em *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. cultivada em meio de cultura contendo de 6-benzilaminopurina (BAP) e 6-furfurillaminopurina ou cinetina (CIN), em diferentes concentrações, em três subcultivos sucessivos de 40 dias cada..... 36

**Tabela 6.** Comprimento dos brotos (cm) em *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. cultivada em meio de cultura contendo de 6-benzilaminopurina (BAP) e 6-furfurillaminopurina ou cinetina (CIN), em diferentes concentrações, em três subcultivos sucessivos de 40 dias cada..... 37

**Tabela 7.** Resposta dos diferentes genótipos de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. no número médio de brotos em nove tratamentos após 120 dias de cultivo (de 40 dias cada)..... 38

**Tabela 8.** Resposta dos diferentes genótipos de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. no comprimento médio dos brotos (cm) em nove tratamentos após 120 dias de cultivo (de 40 dias cada)..... 39

**Tabela 9.** Comprimento médio dos brotos (cm) em *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. cultivada em meio de cultura contendo 6-furfurillaminopurina ou cinetina (CIN), ácido 3-indolibutilico (AIB) e ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) em diferentes concentrações, em três culturas sucessivas de 30 dias cada..... 41

- Tabela 10.** Número médio de folhas formadas em *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. cultivada em meio de cultura contendo 6-furfurillaminopurina ou cinetina (CIN), ácido 3-indolibutilico (AIB) e ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) em diferentes concentrações, em três subcultivos sucessivos de 30 dias cada. 42
- Tabela 11.** Enraizamento/Aclimatização (%) e média ( $\pm$  erro padrão) do número de raízes formadas em *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. em estufa cultivada em vermiculita e terra de Cerrado com 30 dias de cultura..... 43

## ÍNDICE DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Distribuição geográfica de Velloziaceae..... 3
- Figura 2.** Aspecto morfológico de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f..... 5

### CAPÍTULO I

- Figura 3.** *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. cultivada em meio de cultura MS modificado..... 35
- Figura 4.** *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. cultivada no meio de multiplicação contendo 2 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 2,22 µM BAP combinado com 4,64 µM de CIN e 1,48 µM de AIB..... 40
- Figura 5.** Plantas de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. aclimatizadas e aclimatadas. 44
- Figura 6.** Cortes transversais do caule de plantas aclimatizadas de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. mostrando o desenvolvimento da raiz..... 45

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Cortes histológicos (secções transversais) da folha de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f..... 66

## ABREVIACOES

AG <sub>3</sub>	Ácido giberélico
AIB	Ácido indolbutírico
BAP	6-benzilaminopurina
CIN	6-furfurilaminopirina (cinetina)
MS	Meio de cultura formulado por (Murashige e Skoog, 1962)
µM	Micromolar

## 1 - INTRODUÇÃO GERAL

Cerrado é o termo utilizado para designar tanto a formação vegetal do Brasil Central na sua totalidade quanto um tipo fisionômico dessa formação. Caracteriza-se por árvores baixas, inclinadas, tortuosas, irregulares e retorcidas, geralmente com evidências de passagem de fogo (Ribeiro *et al.*, 1983).

A região de Cerrado possui espécies nativas com grande potencial ornamental que podem ser exploradas comercialmente. Para isso, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos eficientes para a produção de mudas em larga escala e com alta qualidade fitossanitária.

Dentre as famílias com potencial ornamental, destaca-se Velloziaceae que apresenta muitas espécies de valor ornamental, tanto pelas folhagens e arquitetura, quanto pela beleza das flores (Menezes, 1970 e 1984; Mercier & Guerreiro Filho, 1989; Silva, 1991; Almeida *et al.*, 1998), sendo pouco explorada pela dificuldade de cultivo e crescimento lento das plantas (Souza, 2005).

Diversos trabalhos foram publicados sobre espécies de Velloziaceae abordando aspectos sobre a anatomia de seus órgãos vegetativos e reprodutivos (Ayensu, 1968, 1974; Ayensu & Skavarla, 1974; Menezes, 1970, 1971b, 1976, 1977, 1984, 1988; Menezes & Semir, 1990), a taxonomia (Killip *et al.*, 1968; Ayensu, 1973, 1974; Mello-Silva, 2004a, 2004b, 2005; Salatino *et al.*, 2001), a germinação de sementes (Ayensu, 1973; Silva, 1985; Silva *et al.*, 1987; Mercier & Guerreiro Filho, 1989; Garcia & Diniz, 2003) e a composição química de órgãos vegetativos (Pinto *et al.*, 1995, 1996; Silva *et al.*, 2001; Branco *et al.*, 2004). A longevidade das Velloziaceae vem motivando por mais de duas décadas estudos fitoquímicos visando encontrar as possíveis substâncias responsáveis por essa característica (Silva *et al.*, 2001).

*Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. conhecida como canela-de-ema, é uma Velloziaceae do Cerrado, que apresenta hábito arbustivo esguio, folhas aglomeradas no ápice dos ramos, com consistência dura e formato alongado, sendo classificadas como graminiformes (Smith, 1962). As flores são vistosas, solitárias na haste e apresentam perigônio lilás, contrastando com o amarelo dos órgãos reprodutivos (Smith & Ayensu, 1976; Almeida *et al.*, 1998). Estas características conferem a espécie um padrão exótico, muito valorizado em projetos de paisagismo.

Além do potencial ornamental, *V. flavicans* é uma das principais espécies não-graminosas consumidas por bovinos em áreas de pastagens nativas do Distrito Federal (Silva & Almeida, 1987). No artesanato, utiliza-se o caule para montagem de arranjos florais e as fibras podem ser usadas para cordoaria ou sacaria (Almeida *et al.*, 1998).

Na literatura consultada não foi encontrado nenhum trabalho sobre a produção de mudas de canela-de-ema pelas vias clássicas e cultura de tecidos. Entretanto, a literatura recente mostra que a cultura de tecidos tem sido utilizada, com sucesso para propagar várias espécies do Cerrado, como o marmelo - *Alibertia edulis* Rich. (Silva *et al.*, 2008), murici-pequeno - *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Nogueira *et al.*, 2007), pequiizeiro - *Caryocar brasiliense* Camb. (Santos *et al.*, 2006), mangabeira - *Hancornia speciosa* (Machado *et al.*, 2004), aroeira - *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Andrade *et al.*, 2000), entre outras.

O presente trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo viável para a produção de mudas de *V. flavicans* por micropropagação, a partir de sementes germinadas assepticamente e caracterizar as diferenças anatômicas das folhas em diferentes condições de cultivo.

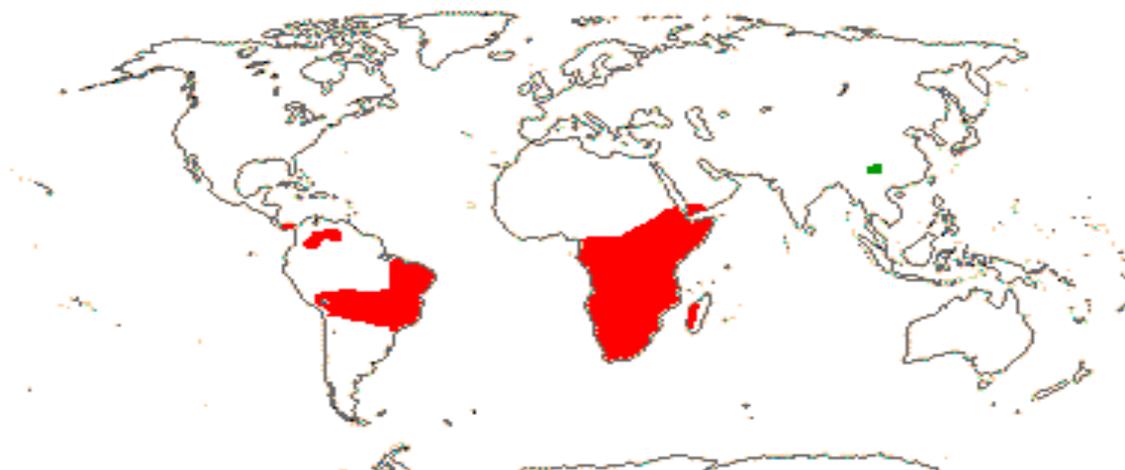
## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - Velloziaceae

Velloziaceae apresenta aproximadamente 250 espécies tropicais sendo constituída por duas subfamílias e seis gêneros (Ayensu, 1973).

É constituída por espécies de pequeno e grande porte, respectivamente mais de seis metros e menos de cinco centímetros, com hábitos bastante variados. As canelas-de-ema são arbustos perenes e apresentam o caule revestido por bainhas fibrosas podendo ser simples ou com ramificações dicotômicas (Smith, 1962; Menezes, 1984).

Ocorre na Nigéria, Zaire, Etiópia, África do Sul, Madagascar, Yemem e na América do Sul (Figura 1) onde apresenta maior grau de endemismo como elementos de campos rupestres. No Brasil a família tem representantes em altitudes a partir de 1.000 m na sua porção oriental e central (Ayensu 1973; Smith & Ayensu, 1974; Jolly, 1983).



**Figura 1.** Distribuição geográfica de Velloziaceae (Fonte: Heywood, 1979).

A literatura mostra divergências quanto a taxonomia das subfamílias. Ayensu (1974) e Smith & Ayensu (1976) incluem em Vellozioideae, os gêneros *Vellozia* e *Nanuza*, e em Barbacenioideae os gêneros *Barbacenia*, *Barbaceniopsis*, *Talbotia* e *Xerophyta*. Já Menezes (1971a) inclui os gêneros *Vellozia* e *Xerophyta* em Vellozioideae, e *Barbacenia*, *Aylthonia*, *Pleurostima* e *Burlemaxia* em Barbacenioideae. Segundo Mello-Silva (2005) a filogenia e classificação continuam sem consenso.

## 2.2 - *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f

*V. flavicans* (Fig. 2A) apresenta folhas aglomeradas no ápice dos ramos, com consistência dura e formato alongado, sendo classificadas como graminiformes (Smith, 1962). A base da folha é persistente e nervação é paralelinérvia (Almeida *et al.*,1998). As flores, solitárias na haste (Figura 2B), são actinomorfas, vistosas e apresentam perigônio lilás, de seis tépalas livres em duas séries muito similares (Smith & Ayensu, 1976; Almeida *et al.*,1998). Os estames são dialistêmones com anteras amarelas e basifixas (Almeida *et al.*,1998), tetraloculares com deiscência latrorsa e os grãos de pólen em tétrades (Menezes, 1988). O ovário é ínfero, trilocular e a placentação é axilar (Smith & Ayensu, 1976). O estilete é filiforme e triangular com o estigma amarelo e capitado (Almeida *et al.*,1998). Os óvulos são do tipo tenuinucelado com o saco embrionário, monospórico e octonucleado, sendo que as antípodas persistem após a fecundação e as sinérgides podem sofrer proliferação (Menezes, 1976). O fruto é uma cápsula loculicida (Fig. 2C) com numerosas sementes, embrião pequeno e endosperma amiláceo (Smith, 1962). O fruto é loculicida trivalvar e apresenta sementes cuneiformes e castanhas (Fig. 2D). A floração ocorre entre abril e junho (Almeida *et al.*,1998) e a frutificação entre abril e outubro.

*V. flavicans* cresce em campo sujo, cerradão distrófico e cerrado *sensu stricto*, nos estados da Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo (Almeida *et al.*,1998).



**Figura 2.** Aspecto morfológico de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f A) Planta no campo, B) Flor, C) Cápsula (barra= 1 cm), D) Detalhe da semente (barra=2 mm).

### **2.3 - Importância econômica das plantas ornamentais**

O cultivo de plantas ornamentais pode apresentar uma alta rentabilidade por área cultivada, superando em cerca de 3 a 5 vezes os resultados obtidos com fruticultura e em até 10 vezes o lucro obtido com a produção de grãos (Ribeiro, 2001). Isso torna a atividade altamente rentável e fixadora de mão-de-obra no campo, constituindo-se uma alternativa para pequenos produtores (Lins & Coelho, 2004).

O Brasil apresenta um grande potencial na produção de diversas espécies de flores tropicais em função da grande variabilidade de microclimas e disponibilidade de água e mão-de-obra (Castro, 1998). No primeiro bimestre de 2007, as exportações brasileiras de plantas e flores ornamentais somaram aproximadamente 5,5 milhões de dólares, com um crescimento de 24,95 % sobre os resultados do mesmo período do ano anterior (Revista Cultivar Hortaliças e Frutas, 2007).

*Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. conhecida como canela-de-ema, que apresenta hábito arbustivo esguio, possui flores vistosas, solitárias na haste e apresentam perigônio lilás, contrastando com o amarelo dos órgãos reprodutivos (Smith & Ayensu, 1976; Almeida *et al.*, 1998). Estas características conferem a espécie um padrão exótico, muito valorizado em projetos de paisagismo. Considerando que as espécies arbustivas ornamentais do Cerrado são pouco pesquisadas para o aproveitamento econômico em paisagismo, a canela-de-ema representa uma alternativa viável para contribuir com a preservação sustentável do Bioma.

### **2.4 - Cultura de tecidos**

Após a rápida multiplicação de orquídeas por Morel em 1965 houve um grande interesse para a aplicação das técnicas da cultura de tecido na propagação assexual de plantas de valor econômico (Hu & Wang, 1983). A cultura de tecidos destaca-se como método de produção de plantas uniformes e sadias em um período de tempo, geralmente menor do que os métodos convencionais de propagação (Crocomo *et al.*, 1985; Evans, 1990; Lee *et al.*, 1995), conquistando um significativo espaço na propagação comercial de plantas. Esse método pode ser usado no melhoramento genético, manejo e conservação de germoplasma, em pesquisas em fisiologia vegetal e produção *in vitro* de metabólitos secundários (Giacometti, 1990).

O controle da morfogênese em explantes cultivados é feito mediante a indução exógena de estímulos químicos e de diversos substratos. A retirada de tecidos de um organismo e a sua transferência para o meio de cultura com nutrientes e reguladores de crescimento libera as células do controle a que estavam submetidas, expondo-as a uma situação alterada que permite que o potencial de divisão celular possa se expressar num novo processo morfogênico (Handro & Floh, 1990).

## 2.5 - Meio de cultura

Os componentes essenciais de um meio nutritivo são: água, sais minerais, carboidrato, reguladores de crescimento e vitaminas. Aminoácidos, amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas podem ser utilizados para otimizar o meio nutritivo (Gamborg, 1984, Torres *et al.*, 2001.). A água é o componente em maior quantidade no meio, em torno de 95%, utiliza-se usualmente a água destilada e deionizada (Caldas *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 2001).

Os minerais essenciais são divididos em macro e micronutrientes e são incluídos no meio nutritivo na forma de sais. Como as vias bioquímicas e metabólicas são conservadas nas células cultivadas, a formulação dos meios de cultura baseia-se nos nutrientes requeridos para plantas *in situ* (Steward, 1983; Caldas *et al.*, 1998; Ramage & Williams, 2002).

Com algumas exceções, a sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, sendo rapidamente convertida em glicose e frutose, fornecendo energia metabólica e esqueleto carbônico para o crescimento das células (Caldas *et al.*, 1998; Gamborg, 1984).

A adição de vitaminas como a tiamina, o ácido nicotínico e a piridoxina normalmente incrementada com o aminoácido glicina são as mais utilizadas nos meios de cultura, destacando-se o papel da tiamina que é benéfica ou mesmo imprescindível para algumas culturas (Caldas *et al.*, 1998; Gamborg, 1984).

As auxinas e citocininas são as classes de fitorreguladores mais utilizadas na cultura de tecidos (Caldas *et al.*, 1998). O envolvimento do AIA e da cinetina no crescimento ou na organogênese foi estabelecido por Skoog & Miller (1957). Na cultura de tecidos as auxinas são utilizadas por induzirem divisões celulares (Gamborg, 1991), induzir calos em explantes e enraizamento de plantas (Hinojosa, 2000). A adição de citocininas no meio de cultura é favorável ou até necessária (Torres *et al.*, 1998), sendo utilizadas nas etapas de regeneração dos calos ou na

multibrotação de gemas axilares e/ou apicais, desempenhando um papel essencial na diferenciação e regeneração de muitas espécies (Gamborg, 1991; Barreto Cid, 2000). As giberelinas, utilizadas para estimular o alongamento dos brotos, são pouco empregadas, pois o suprimento endógeno é, geralmente suficiente (Gattapaglia & Machado, 1998). Já o ácido abscísico tem sido bastante utilizado para evitar a maturação precoce e facilitar o desenvolvimento normal dos embriões na embriogênese somática (Caldas *et al.*, 1998).

## 2.6 - Micropropagação

A propagação assexuada *in vitro*, também chamada de micropropagação, tem sido a aplicação mais prática e de maior impacto da cultura de tecidos (Hu & Wang, 1983; Gattapaglia & Machado, 1998).

Murashige (1974) sugere os seguintes estágios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*:

Estágio I – seleção de explantes, desinfestação e Inoculação em meio nutritivo sob condições assépticas;

Estágio II - multiplicação dos brotos em meio de cultura;

Estágio III – transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e transplante para o solo ou substrato.

Dependendo do explante e da sua manipulação, a micropropagação pode seguir as seguintes rotas de multiplicação: estímulo no desenvolvimento de gemas axilares, indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta e embriogênese somática (Hu & Wang, 1983; Gattapaglia & Machado, 1998). Para Thorpe & Patel (1984), em geral o processo para formação de plantas via organogênese requer quatro estágios distintos: indução das gemas; desenvolvimento e multiplicação das gemas; enraizamento e aclimação das plantas. Evans (1990) estabelece quatro estágios para a micropropagação via gema axilar: seleção da planta doadora e desinfestação dos explantes; estabelecimento das gemas axilares em cultura; multiplicação em cultura e enraizamento das plantas *in vitro* e transferência para o substrato.

O sucesso da micropropagação depende de vários fatores. A atenção não deve estar exclusivamente voltada para a composição do meio de cultura, mas também na manipulação da planta-matriz, estágio de desenvolvimento do explante, concentração endógena de hormônios,

procedimentos de subcultivos, condições ambientais e microambientais dentro do frasco e no transplântio. Dentre os fatores físicos que podem interferir nas culturas estão: o estado físico do meio, pH, luz e temperatura (Hu & Wang, 1983; Gattapaglia & Machado, 1998). O estado fisiológico e fitossanitário da planta matriz interferem de forma significativa no comportamento da cultura; plantas livres de patógenos e sem deficiência nutricional e hídrica fornecem explantes mais apropriados para o cultivo *in vitro* (Gattapaglia & Machado, 1998).

Segundo Thorpe & Patel (1984) e Crocomo & Oliveira (1995), teoricamente qualquer parte da planta pode ser cultivada *in vitro*, buscando-se geralmente materiais juvenis, sob condições químicas e físicas tais que elas possam sofrer dediferenciação formando calos; podem-se ainda inocular ápices ou gemas axilares que propiciam baixas frequências de variação genética.

Alguns trabalhos de micropropagação em monocotiledôneas feitos por Gangopadhyay *at al.* (2004); Kishore *at al.* (2006); Nhut (1998); Lakshmanan *at al.* (2006); Wawrosch *at al.* (2001); Wang *at al.* (2005) e Santacruz-Ruvalcaba (1999). Holdgate (1997) e Flick *at al.* (1983) citam procedimentos e as referências para regeneração *in vitro* de espécies de Iridaceae, Liliaceae e Amaryllidaceae, Agavaceae, Araceae e Discoraceae, onde constam a concentração de fitoreguladores para a formação de calo ou broto, o meio nutritivo e o tipo de explante utilizado.

O uso restrito das Velloziaceas como plantas ornamentais pode ser atribuído às limitações no cultivo e ao crescimento lento das plantas (Souza, 2005). Desta forma o alongamento *in vitro* pode favorecer o aproveitamento comercial de suas espécies.

## **2.7 - Alongamento**

O crescimento da planta é um processo complexo e dinâmico que está submetido aos controles genético e ambiental e permitem que respondam e se adaptem as condições externas (Hinojosa, 2000). Hormônios regulam diversos processos do crescimento e desenvolvimento das plantas geralmente agindo de forma integrada. O conceito de cross-talk entre hormônios tem atraído muita atenção, pois propõe que o caminho dos sinais hormonais estabelece uma complexa teia de interações de informações (Chow & Maccourt, 2004). Auxinas, giberelinas e brassinosteroides são hormônios envolvidos com o alongamento celular (Kende & Zeevsrt, 1997; Clouse & Sasse, 1998; Nemhauser *et al.*, 2006).

Auxina é o nome genérico para um grupo de fitorreguladores que influenciam a divisão, alongamento e diferenciação celular (Teale *et al.*, 2006). As manipulações antropogênicas dos efeitos fisiológicos das auxinas são utilizadas na propagação de plantas, através da seleção artificial com o desenvolvimento de variedades modernas (Woodward & Bartel, 2005).

As auxinas exercem papel principal nos processos de desenvolvimento em muitos níveis, durante o ciclo de vida do vegetal, participando diretamente na organização dos padrões celulares e na programação genética da morfogênese e a sua transdução de sinal influenciam numerosas respostas fisiológicas. (Thomas & Sachs, 2001; Teale *et al.*, 2006).

Os efeitos da auxina são muitos e difíceis de serem separados, mas podem ser divididos em duas categorias: efeitos da expansão celular e efeitos da divisão celular. A expansão celular mediada pelo sinal da auxina envolve a hiperpolarização da membrana, degradação da parede celular, como os arabinogalactanos e de proteínas, como a expansina, extensinas e peroxidases. A expressão de muitos genes do ciclo celular (fases G1, S, G2 e M) é induzida pela auxina, envolvendo proteínas na fase S e na transição G2-M. A progressão das fases do ciclo celular é regulada pela atividade da ciclinas dependentes de kinases (CDKs), cyclinas, CDK-inibidores, entre outros. (Jurado *et al.*, 2008; Teale *et al.*, 2006; Teale *et al.*, 2005; Vanneste *et al.*, 2005; Himanen *et al.*, 2002).

Diferentes plantas produzem diferentes conjugados com as auxinas (Woodward & Bartel, 2005), a maior parte do AIA das plantas está sob a forma de conjugados inativos. Sementes de *Arabidopsis* mantém aproximadamente 90% do AIA conjugado com amidas, aproximadamente 10% com éster e aproximadamente 1% livre (Tam *et al.*, 2000). Os conjugados da auxina e o catabolismo decrescem o nível da auxina ativa e, a síntese de novo e a hidrólise dos conjugados contribuem para regular o desenvolvimento e a homeostase de AIA. A biossíntese de auxina está associada a locais de rápida divisão celular e crescimento, embora quase todos os tecidos vegetais sejam capazes de produzi-la em baixos níveis. Quimicamente a característica que unifica todas as moléculas que possuem atividade auxínica é a existencia de uma cadeia lateral ácida que deve estar ligada a um anel aromático (Taiz & Zeiger, 2004). A auxina é sintetizada pelas rotas dependentes e independentes do triptofano e sua redistribuição envolve muitas proteínas, a mais bem estudada são as proteínas PIN que mediam o efluxo influenciando em muitos processos do desenvolvimento (Teale *et al.*, 2006, Woodward & Bartel, 2005).

Cerca de 126 gibelerinas (AG1 - AG126) ocorrem em plantas vasculares, fungos e bactérias (Macmillan, 2002); poucas são biologicamente ativas como hormônios e a grande maioria serve como precursores ou formas inativas sendo numeradas na ordem da sua descoberta.

As giberelinas estão relacionadas principalmente com expansão celular, crescimento, quebra de dormência, desenvolvimento do fruto e germinação de sementes (Huttly & Phillips, 1995). São caracterizadas bioquimicamente como ácidos diterpenoides tetracíclicos de 19 ou 20 átomos de carbono com a estrutura básica de ent-giberelanos e biossintetizadas a partir do ent-caureno.

A biossíntese de giberelinas pode ser separada em três estágios, de acordo com a natureza das enzimas envolvidas e a localização na célula: Terpenos ciclases em protoplastídeos, monooxigenases associadas com retículo endoplasmático e dioxigenases no citosol (Taiz & Zeiger, 2004; Matsumoto, 2000; Rademacher, 2000).

Plantas mutantes (*Arabidopsis* Ga1-3) quando comparadas ao tipo selvagem são menores, o domínio apical é reduzido, apresentam folhas mais escuras, redução da fertilidade e as sementes não germinam. A adição de AG restaura todas as características do tipo selvagem ao mutante, embora as conseqüências fenotípicas variem de espécie para espécie. Plantas deficientes de AG são menores o que mostra a essencialidade de AG para o crescimento normal das plantas (Richards *et al.*, 2001).

Brassinosteroides estão envolvidos com a regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas, quando aplicados em nM e  $\mu$ M causam alongamento em hipocótilos, epicótilos e pedúnculos em dicotiledôneas e coleótilos e mesocótilos em monocotiledôneas. Tecidos jovens são particularmente responsivos aos brassinosteroides e as concentrações endógenas estão diretamente envolvidas no controle da expansão celular. A indução desta expansão é acompanhada da extrusão de prótons e hiperpolarização da membrana celular, observados na expansão assimétrica em arroz (Clouse & Sasse, 1998; Fujioka & Yokota, 2003).

A relação entre auxina e giberelina foi evidenciada com estudos envolvendo inibidores do transporte de auxinas e a sua aplicação no caule de ervilha, o que reduz dramaticamente a concentração de AG<sub>1</sub>. A decaptação do ápice causa efeito similar e a aplicação de AIA exógeno substitui a gema apical restabelecendo os níveis de AG<sub>1</sub>, indicando que a regulação dos níveis de giberelina depende da ação da auxina (Ross *et al.*, 2000). Partes aéreas de plantas anãs de ervilha giberelina deficientes são muito mais curtas do que as das plantas normais. Por outro lado, não há

interação de auxina e giberelinas no crescimento de hipocótilos de *Arabidopsis* (Collett *et al.*, 2000), e a giberelina endógena regula seu próprio metabolismo, pois a aplicação de giberelina provoca uma diminuição da expressão dos genes biossintéticos e um aumento na transcrição do gene de degradação (Elliot *et al.*, 2001).

Diferente das auxinas, as giberelinas aumentam a extensibilidade da parede celular sem acidificação e o tempo antes do início do crescimento estimulado por giberelina é maior que o observado por auxina indicando mecanismos diferentes de promoção de crescimento distintos, embora as respostas de crescimento à aplicação de giberelinas e auxinas são aditivas (Taiz & Zeiger, 2004).

## **2.8 - Estudos anatômicos**

Plantas xerófitas são aquelas de hábitos secos, que são capazes de se adaptar as influências desfavoráveis da atmosfera e a seca edáfica durante seu desenvolvimento, graças a propriedades anatomo-fisiológicas (Menezes, 1984). A maioria das espécies brasileiras de Velloziaceae cresce em campos rupestres com solos rasos e pedregosos não havendo disponibilidade de lençol freático para as plantas, inúmeras espécies crescem também sobre as rochas, necessitando de uma maneira própria de reter água (Menezes, 1984).

As folhas das angiospermas apresentam grande variação de estruturas devido à disponibilidade ou não de água. As folhas de monocotiledôneas variam em forma e estrutura e vão da hidromorfa a xeromorfa extrema (Esau, 1974; Menezes *et al.*, 2006). As folhas xeromorfas apresentam elevada relação volume-superfície (folhas pequenas e compactas), mesofilo espesso com parênquima paliçádico mais desenvolvido que o esponjoso ou só paliçádico, pequeno volume de espaço intercelular, rede vascular compacta, grande frequência de estômatos, venação densa associada à baixa frequência de extensão da bainha. Um grande número de representantes pode apresentar: hipoderme, abundante desenvolvimento de esclerênquima, tricomas, paredes celulares espessas principalmente na epiderme, cutícula grossa, estômatos em sulcos, parênquima aquífero e sistema vascular bem desenvolvido (Esau, 1974; Menezes *et al.*, 2006).

Algumas estruturas estão relacionadas com a capacidade de retenção de água em *Velloziaceae*, como as expansões laterais do xilema dos feixes vasculares das folhas denominados

de traqueídes de transfusão, como nas gimnospermas, que exercem um importante papel na capacidade de revivescência (capacidade de voltar a ficar verde após secar) já verificado em alguns grupos de *Xerophyta* e *Pleurostima* (Menezes, 1984).

A lâmina foliar de Velloziaceae pode apresentar: células epidérmicas com formato retangular, estômatos paracíticos ou tetracíticos podendo ocorrer em ambas às faces, mas com maior freqüência na face abaxial, cutícula grossa em volta dos estômatos e na face abaxial, tricomas unicelulares ou multicelulares. O mesofilo pode apresentar parênquima paliçádico e esponjoso, feixes vasculares com bainha simples (eudodérmica) ou dupla (endodérmica e mestomática) com cordões floemáticos mais afastados ou menos afastados, colaterais e acompanhados por fibras de origem pericíclica que podem apresentar três padrões de distribuição: restrito ao feixe vascular, com extensão até a superfície abaxial e com extensão até as duas superfícies. (Ayensu 1974; Smith & Ayensu, 1976; Menezes 1984).

### 3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. xiii+464p.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia** **24**, n.1, p.174-180, Lavras, 2000.
- AYENSU, E. S. The anatomy of Barbaceniopsis, a new genus recently described in the velloziaceae. **American Journal of Botany**. Vol. 55, nº 4, 399-405, 1968.
- AYENSU, E. S. Biological and morphological aspects of the velloziaceae. **Biotropica** **5**(3): 135-149, 1973.
- AYENSU, E. S. Leaf anatomy and systematics of new world velloziaceae. **Smithsonian Contributions to Botany** **15**: i-vi+1-125, 1974.
- AYENSU, E. S.; SKVARLA. Fine Structure of velloziaceae pollen. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** **101**, nº 5, 250-206, 1974.
- BARRUETO CID, L. P. Citocininas. In: BARRUETO CID, L. P., **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000, 180p.
- BRANCO, A.; PINTO, A. C.; FILHO, R. B. Chemical constituents from *Vellozia graminifolia* (Velloziaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciência**. **76** (3): 505-518, 2004.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, DF, Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998. v.1. 864p.
- CASTRO, C. E. F. Cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** **v.4**, n.1/2 : 1- 46, Campinas, 1998.
- CHOW, B.; MACCOUNT, P. Crosstalk in plant signal transduction special issue. **Journal of Experimental Botany** **55**, n.395, 247-251, 2004.
- CLOUSE, S.D.; SASSE, J. M. Brassinosteroides: Essential regulators of plant growth and development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **49**: 427-451, 1998.
- COLLETT, C. E.; HARBERD, N. P.; LEYSER, O. Hormonal control of Arabidopsis hypocotyl elongation. **Plant Physiology** **124**: 553-561, 2000.

- CROCOMO, O. J.; GONÇALVES, A. N.; CABRAL, J. B. Clonagem e melhoramento de plantas in vitro. In: **Simpósio Nacional de Cultura de Tecidos Vegetais**, Brasília, DF, 1985.
- CROCOMO, O. J.; OLIVEIRA, E. T. Biotecnologia de plantas como um programa de produção vegetal. In: LEE, T. S. G.; **Biofábrica: Produção industrial de plantas “in vitro”**. Araras : UFSCar, p. 9-17, 1995.
- ELLIOT, R. C.; ROSS, J. J.; SMITH, J. J.; LESTER, D. R. Feedforward regulation of gibberellin deactivation in pea. **Journal of Plant Growth Regulation** **20**: 87-94, 2001.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo, Edgard Blucher. 1974
- EVANS, N. E. Micropropagation, axilar bud multiplication. In: POLLARD, J. W., WALKER, J. M. **Methods in molecular biology, plant cell and tissue culture**. Humana Press, Clifton, New Jersey, 1990.
- FLICK, C. E.; EVANS, D. A.; SHARP, W. R. Organogênese. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; ALMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture: the techniques for propagation and breeding**. New York, Macmillan, 1983, v.1, 13-81.
- FUJIOKA, S.; YOKOTA, T. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. **Annual Review of Plant Biology**. **54**: 137-164, 2003.
- GAMBORG, O. L. Media preparation. In : LINDSEY, K. **Plant tissue culture manual**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 1991, p 1 - 24.
- GAMBORG, O. L. Plant cell cultures: Nutrition and media. In : VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York : Academic Press, 1984, v.1.
- GANGOPADHYAY, G.; BANDYOPADHYAY, T.; MODAK, K. B.; WONGPORNCHAI, S.; MUKHERJEE, K. K. Micropropagation of Indian pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.), a rich source of 2-acetyl-1-pyrroline. **Current Science** **87**: 11-10, 2004.
- GARCIA, Q.; DINIZ, I. Comportamento Germinativo de Três Espécies de *Vellozia* da Serra do Cipó, MG, **Acta Botânica Brasileira** **17**, n. 4, p. 487-494, 2003.
- GATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF, Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998. v. 1.
- GIACOMETTI, D. C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP/ EMBRAPA-CNPq, 1990.

- HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. Aspectos básicos do controle da morfogênese in vitro. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. 433p.
- HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. London. Croom Helm, 1979.
- HIMANEN, K.; BOUCHERON, E.; VANNESTE, S.; ENGLER, J. A.; INZÉ, D.; BEECKMAN, T. Auxin-Mediated Cell Cycle Activation during early lateral root initiation. **The Plant Cell** **14**, 2339–2351, 2002.
- HINOJOSA, G. F. Auxinas. In: BARRUETO CID, L. P. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000, 180p.
- HOLDGATE, D. P. Propagation of ornamentals by tissue culture. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Plant cell, tissue, and organ culture**. Springer-Verlag. 1997.
- HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip, and bud cultures. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; ALMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture: the techniques for propagation and breeding**. New York, Macmillan, 1983, v.1, 177-227.
- HUTTLY A. K.; PHILLIPS A. L. Gibberellin-regulated plant genes. **Physiol. Plant.** **95**: 310–317, 1995.
- JOLY, A. B. **Botânica: Introdução a Taxonomia Vegetal**. 6ed. São Paulo, Ed. Nacional, 1983, 777p.
- JURADO, S.; DIAZ-TRIVIN, S.; ABRAHAM, Z.; MANZANO, C.; GUTIERREZ, C.; POZO, C. SKP2A and F-box protein that regulates cell division is degraded via the ubiquitin pathway. **The Plant Journal** **53**, 828-841, 2008.
- KENDE, H.; ZEEVAART, J. A. D. The five classical plant hormones. **The plant cell.** **9**, 1197-1210, 1997.
- KILLIP, P. E.; GUATRECASAS, J.; SMITH, L. B.; EWAN, J. Systematic plant studies. **Contributions from the United States National Herbarium** **35**, 1968.
- KISHORE, N. S, KBRS, V.; LAKSHMI, A. Y.; PASHUPATINATH, E.; RAO, S. V.; SEETHARAMA, N. *In vitro* culture methods in sorghum with shoot tip as the explant material. **Plant Cell Reports** **25**: 174-182, 2006.
- LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C. .L.; BERDING, N.; SMITH, G. R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane. **Plant Cell Reports** **25**: 1007-1015, 2006.

- LEE, T. S. G.; PICOLLO, L. T.; MENEGHIN, S. P.; ARAUJO, S. M. S. S. Biofábrica: Produção industrial de plantas “in vitro” . In: LEE, T.S.G.; **Biofábrica: Produção industrial de plantas “in vitro”**. Araras : UFSCar, 1995, p. 9-17.
- LINS, S. R. O.; COELHO, R. S. B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileiro** **29**: 332-335, 2004.
- MACHADO, L. L.; RAMOS, M. L. G.; CALDAS, L. S.; VIVALDI, L. J. Seleção de matrizes e clones de mangabeira para o cultivo in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **39**, n.5, p.431-435, Brasília, 2004.
- MACMILLAN, J. Ocurrence of Gibberellins in vascular plants, fungi and bactéria. **Journal of Plant Growth Regulation** **20**: 387-442, 2002.
- MATSUMOTO, K. Giberelina. In: BARRUETO CID, L. P. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000, 180p.
- MELLO-SILVA, R. Morphological analysis, phylogenies and classification in Velloziaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society** **148**: 157-173, 2005.
- MELLO-SILVA, R. Novitates *Vellozia cearum* florae phanerogamicae Sancti Pauli. **Ver. Brás. Bot.** **27**, nº3, 2004a.
- MELLO-SILVA, R. Sistemática de *Vellozia cândida* (Velloziaceae). **Rodriguésia** **55** (84): 59-64, 2004b.
- MENEZES, N. L. **Estudos anatômicos e a taxonomia da família Velloziaceae**. 1970. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MENEZES, N. L. New taxa and new combinations in Velloziaceae. **Ciência & Cultura** **23**, 421-422, 1971a.
- MENEZES, N. L. Traqueídes de transfusão no gênero *Vellozia* vand. **Ciência & Cultura** **23**, 389-409, 1971b.
- MENEZES, N. L. Megaesporogênese, megagametogênese e embriogênese em Velloziaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** **4**: 41-60, 1976.
- MENEZES, N. L. Aspectos morfológicos e anatômicos do desenvolvimento de plântulas de Velloziaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** **5**: 65-77, 1977.
- MENEZES, N. L. **Características anatômicas e a filogenia, na família Velloziaceae**. 1984. Tese de Livre-Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- MENEZES, N. L. Evolution of the anther in the family Velloziaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** **10**: 33-41, 1988.
- MENEZES, N. L.; SEMIR, J. New Considerations regarding the corona in the Velloziaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **77**: 539-544, 1990.
- MENEZES, N. L.; SILVA, D. C.; PINNA, G. F. A. M. Folha. In: APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa, Ed. UFV, 2006.
- MERCIER, H.; GUERREIRO FILHO, O. Germinação de *Pleurostima fanniei* Menezes, *Pleurostima Rogieri* (Hort. Ex. Moore & Ayres) Menezes e *Vellozia alata* L. B. Smith (Velloziaceae) sob diferentes condições de luz e temperatura. **Hoehnea** **16**: 195-202, 1989.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual review of Plant Physiology** **23**, 135-166, 1974.
- NEMHAUSER, J. L.; HONG, F.; CHORY, J. Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. **Cell** **126**: 467-475, 2006.
- NHUT, D. T. Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via *in vitro* stem node and pseudo-bulblet culture. **Plant Cell Reports** **17**: 913-916 1998.
- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia** **31**, n. 2, p. 366-370, mar./abr., 2007.
- PINTO, A. C.; ANTUNES, O. A. C.; REZENDE C. M.; CORREIA, R. D.; Minor clethantane and tetranorfriedolabdane from *Vellozia flavicans*. **Phytochemistry** **38**, nº 5, 1269-1271, 1995.
- PINTO, A. C.; REZENDE C. M.; ANTUNES, O. A. C.; CORREIA, R. D. There isomeric diterpenes from *Vellozia flavicans*. **Phytochemistry** **42**, nº3, 767-769, 1996.
- RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **51**: 501-531, 2000.
- RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant** **38**: 116-124, 2002.
- REVISTA CULTIVAR HORTALIÇAS E FRUTAS, ed. 43 abril-maio; 2007.

- RIBEIRO, T. R. **Produção de mudas e flores de plantas ornamentais tropicais**. Petrolina: Embrapa, 42p, 2001.
- RIBEIRO, J. F.; SANO, S. M.; MACEDO, J.; SILVA, J. A. da. **Os principais tipos fitofisionômicos da região dos cerrados**. Planaltina, EMBRAPA-CPAC, 28p Boletim de pesquisa, 21, 1983.
- RICHARDS, D. E.; KING, K.; AIT-ALI, E. T.; HARBERD, N. P. How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **52**: 67–88, 2001.
- ROSS, J. J.; NEILL, D. P.; SMITH, J. J.; KERCKHOFFS, L. H. J.; ELLIOTT, R. C. Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. **The plant Journal** **21**(6), 547-552, 2000.
- SANTACRUZ-RUVALCABA, F.; GUTIERREZ-PULIDO, H.; RODRIGUEZ-GARAY, B. Efficient in vitro propagation of *Agave parrasana* Berger. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **56**: 163-167, 1999.
- SANTOS B. R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M.; MARTINOTTO, C.; SOARES F. P.; SILVA, D. P. C.; PAIVA, P. D. O. Micropropagação do pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura** **28**, n. 2, p. 293-296, Jaboticabal - SP, 2006.
- SHIBLI, R. A.; AJLOUNI, M. M. Somatic embryogenesis in the endemic black iris. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **61**: 15-21, 2000.
- SILVA, J. C. S. Aspectos da germinação de *Vellozia flavicans* in: **Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo** **5**, Botucatu, SP, 1985, p.136.
- SILVA, J. C. S.; ALMEIDA S. P. Fisiologia da germinação de espécies nativas dos cerrados com potencial forrageiro, in: **Relatório Técnico anual do Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados**, Planaltina, DF, EMBRAPA-CPAC. 1987.
- SILVA, J. C. S. Fenologia de espécies do estrato herbáceo-arbustivo dos cerrados, in: **Relatório Técnico anual do Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados**, Planaltina, DF, EMBRAPA-CPAC. 1991.
- SILVA, J. C. S.; ALMEIDA S. P.; RIBEIRO, J. F. Fenologia de *Vellozia flavicans* Martius ex-Schultes f., in: **Relatório Técnico anual do Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados**, Planaltina, DF, EMBRAPA-CPAC. 1987.

- SILVA, G. C.; VALENTE, L. M. M.; PATITUCCI, M.L.; PINTO, A.C.; MENEZES, N. L. Diterpenóides com Esqueleto Cleistantano de *Vellozia aff. Carrunculares* Martius ex Seubert (velloziaceae). **Química Nova** **24**, n. 5, p. 619-625. 2001.
- SILVA, F. A. B. S.; PEREIRA, L. A. R.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. **Brazilian Archives of Biology and Technology** **55** (6) 1103-1114, 2008.
- SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regularion of growth and organ formation in plant fissue cultured. In vitro. **Symposia of the Society for Experimental Biology** **11**, p.118-131, 1957.
- SMITH, L. B. A synopsis of the american Velloziaceae. **Contributions from the United States National Herbarium** **35**: 251-292, 1962.
- SMITH, L. B.; AYENSU, E, S. Classification of old world Velloziaceae. **Kew Bulletin** **29**: 181-205. 1974.
- SMITH, L. B.; AYENSU, E.S. A Revision on american Velloziaceae. **Smithsonian Contributions to Botany** **30**:1-172, 1976.
- SOUZA, V. C. **Botânica sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, Baseado em APG II, Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum. 2005.
- STEWART, F. C. Reflections on aseptic culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; ALMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture: thechniques for propagation and breeding**. New York, Macmillan, 1983, v.1. p.1-10
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre, Artmed, 3 ed. 2004.
- TAM, Y. Y.; EPSTEIN, E.; NORMANLY, J. Characterization of auxin conjugates in arabidopsis. low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose. **Plant Physiology** **123**, pp. 589-595, 2000.
- TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; DITENGOU, F.; PALME, K. Auxin and the developing root of *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum** **123**: 130-138. 2005.
- TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: signalling, tranport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** **7**, 2006.
- THOMAS BERLETH, T.; SACHS, T. Plant morphogenesis: long-distance coordination and local patterning. **Current Opinion in Plant Biology** **4**: 57-62, 2001.
- THORPE, T. A.; PATEL K. R. Clonal propagation: adventitious buds. In : VASIL, I. K., **Cell culture and somatic cell gemetics of plants**. Orlando, Florida, Academic Press, Inc, 1984.

- TOMBOLATO, A. F. C.; VEIGA, R. F. A.; BARBOSA, W.; COSTA, A. A.; JUNIOR R. B.; PIRES, E. G. **O Agrônomo** **56**, Campinas, 2004.
- TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, DF, Embrapa-SPI: Embrapa-CNPH, 1998. v. 1.
- TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. R.; WILADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**. Circular técnica 24, Embrapa-CNPH, Brasília-DF, 2001.
- VANNESTE, S.; MAES, L.; SMET, I.; HIMANEN, K.; NAUDTS, M.; INZE, D.; BEECKMAN, T. Auxin regulation of cell cycle and its role during lateral root initiation. **Physiologia Plantarum** **123**: 139-146. 2005
- WANG, J.; SELISKAR, D. M.; GALLAGHER, J. L. Tissue culture and plant regeneration of the salt marsh monocots *Juncus roemerianus* and *Juncus gerardi*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** **41**:274-280, 2005.
- WAWROSCHEK, C.; MALLA, P. R.; KOPP, B. Micropropagation of *allium wallichii* Kunth a threatened medicinal plant of Nepal. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** **37**: 555-557, 2001.
- WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. **Annals of Botany** **95**: 707-735, 2005.

## CAPÍTULO I

### **Micropropagação de canela-de-ema (*Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f.)**

## Micropropagação de canela-de-ema (*Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f.)

### Resumo

A canela-de-ema (*Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f.) é um arbusto nativo do Cerrado brasileiro que apresenta grande potencial ornamental. Limitações no cultivo convencional e o crescimento lento justificam a utilização de técnicas da cultura de tecidos para a propagação da espécie. O objetivo do presente trabalho foi de estabelecer um protocolo de micropropagação de para canela-de-ema. Foram testadas sementes armazenadas por seis meses e recém coletadas. Todas as sementes foram desinfestadas em fungicida carbendazim (nome comercial Derosal<sup>®</sup>), 300 mL.L<sup>-1</sup> em água, por imersão durante 24 h, seguido de álcool 70% por 1 min e solução de hipoclorito de sódio comercial a 2-2,5%, contendo 300 µL de Tween 80 por 100 mL de solução durante 20 min. As sementes armazenadas foram inoculadas em meio MS com 0% e 3% de sacarose nas temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35 °C. A melhor porcentagem de germinação foi obtida entre 25 °C e 35 °C com ou sem sacarose. As sementes recém coletadas foram inoculadas em meio MS com diferentes concentrações de sacarose 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6%. A maior porcentagem de germinação foi observada no meio de cultura sem sacarose. A diferença entre a germinabilidade das sementes armazenadas e recém coletadas indicam perda de viabilidade. Na fase de multiplicação as partes aéreas de plantas de 30 dias de cultura, oriundas de germinação asséptica, foram inoculadas em meio MS com 1,48 µM de AIB (exceto no controle sem fitorreguladores) e três concentrações de BAP (0,0; 2,22 e 4,44 µM) combinadas com CIN (0,0; 2,32 e 4,64 µM), em três subcultivos, de 40 dias cada, formando um fatorial 3x3x3. O pH foi ajustado a 5,7±0,1 e 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 8 g.L<sup>-1</sup> de ágar foram adicionados ao meio. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. O maior número de brotos foi obtido com 4,44 µM de BAP combinado com 1,48 µM de AIB no terceiro subcultivo. Na fase de alongamento, as diferentes concentrações de AG<sub>3</sub> (5,77; 11,54 e 17,32 µM) testadas, combinadas com 2,32 µM de CIN e 2,46 µM AIB, não influenciaram significativamente os brotos de *V. flavicans*. O enraizamento e a aclimatização foram testados *ex vitro*, em câmara de crescimento e em casa de vegetação. As bases dos brotos foram tratadas com AIB (1000 ppm) ou gel enraizante da marca Selagel<sup>®</sup>; nos brotos controle não foi aplicado nenhum tratamento O enraizamento *ex vitro* e a aclimatização apresentaram percentuais acima de 40% em todos os tratamentos. Todas as plantas aclimatizadas sobreviveram após a transferência para o viveiro. A análise anatômica mostra que as raízes adventícias se diferenciam na região do periciclo e nos feixes vasculares, indicando que a vascularização da raiz está conectada com a do caule.

**Palavras-chave:** *Vellozia flavicans*, germinação *in vitro*, mudas, micropropagação.

## Abstract

Canela-de-ema (*Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f.) is a shrub native of Brazilian Cerrado and presents great potential ornamental. Limitations in the conventional cultivation and the slow growth of the plant justify the use of techniques of tissue culture to propagate the species. The objective of this study was to establish a protocol for micropropagation of canela-de-ema. Six month-old and recently collected seeds were tested. All seeds were disinfected with carbendazim (trade name Derosal ®) fungicide diluted to 300 mL.L<sup>-1</sup> in water for 24 h, and rinsed in 70% alcohol for 1 min. Additionally, the seeds were soaked in commercial bleach with 2-2.5% of active chlorine containing of Tween 80 (3 mL.L<sup>-1</sup>) for 20 min. The six-month old seeds were inoculated in MS medium with 0% and 3% sucrose and cultivated at 15, 20, 25, 30 and 35 °C. The best percentage of germination was obtained between 25 °C and 35 °C with or without sucrose. The freshly collected seeds were inoculated in MS medium with different sucrose concentrations: 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6%. The highest percentage of germination was observed in the culture medium without sucrose. The difference between the germination of six-month old and newly collected seeds indicate that occurred a loss of seed viability. In the multiplication phase, after 30 days the aerial parts of the plants were inoculated in MS media containing different concentrations of BAP (0.0, 2.22 and 4.44 µM) combined with KIN (0.0, 2.32 and 4.64 µM) plus IBA 1.48 µM in all combinations, except the control treatment. The medium pH was adjusted to 5.7-5.8, 20 g.L<sup>-1</sup> sucrose and 8 g.L<sup>-1</sup> agar. The experimental design was randomized, in three successive subcultures of 40 days each. The highest number of sprouts was obtained with 4.44 µM of BAP and 0.00 µM of KIN in the third subculture. Different GA<sub>3</sub> concentrations (5.77, 11.54 and 17.32 µM) were tested in combination with 2.32 µM of KIN and 2.46 µM IBA. Results showed no influence of these growth regulators in the elongation of *V. flavicans* shoots. *Ex vitro* rooting and acclimatization were done in growth chamber and the greenhouse. For that, basal region of the shoots were treated with IBA (1000 ppm) or rooting gel Selagel®; and the control treatments had no growth regulators. The rooting *ex vitro* and acclimatization showed more than 40% of success in all treatments. All acclimatized plants survived after transferred to the nursery. The anatomical analysis showed that the adventitious roots differentiated in the pericycle/endodermis region as well as from the vascular bundles, indicating that the vascularization of the roots is connected to the stem vasculature.

**Key words:** *Vellozia flavicans*, *in vitro* germination, seedlings, micropropagation

## 1 - INTRODUÇÃO

Velloziaceae apresenta aproximadamente 250 espécies tropicais, circunscritas em duas subfamílias e seis gêneros (Ayensu, 1973), abrangendo muitas espécies com valor ornamental, tanto por sua arquitetura peculiar, quanto pela beleza de suas flores e folhagens (Menezes, 1970; 1984; Mercier & Guerreiro Filho, 1989; Silva, 1991; Almeida *et al.* 1998).

O potencial ornamental da família não é bem explorado, necessitando de pesquisas para aproveitamento paisagístico (Ayensu, 1973). O uso restrito destas plantas como ornamentais pode ser atribuído às limitações no cultivo e ao crescimento lento (Souza, 2005). Embora diversos estudos tenham sido realizados sobre a germinação de sementes (Ayensu, 1973; Silva, 1985; 1987; Mercier & Guerreiro Filho, 1989; Garcia & Diniz, 2003; Oliveira & Borghetti, 2003), na literatura consultada não foram encontrados trabalhos sobre a propagação e desenvolvimento das plantas para a produção de mudas das espécies de Velloziaceae.

A biotecnologia, em especial a cultura de tecidos, tem auxiliado a domesticação de diversas espécies ornamentais brasileiras (Tombolato, 2004), principalmente da Mata Atlântica. Dentre as famílias estudadas, que apresentam espécies comercializadas, destacam-se, entre outras, as Amaryllidaceae, Orchidaceae e Bromeliaceae.

Considerando-se o potencial ornamental e a representatividade da família Velloziaceae no Cerrado, estudos sobre a propagação são de grande relevância. Neste contexto, a micropropagação é uma alternativa viável que apresenta a vantagem de multiplicar rapidamente a planta, sem a presença de patógenos e pragas, que acompanham outros métodos de propagação vegetativa (Melo *et al.*, 2008).

O objetivo deste trabalho foi de estabelecer um protocolo de micropropagação de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f.

## **2-MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 - Coleta e conservação do material vegetal**

Cápsulas de *Vellozia flavicans* foram coletadas antes da descência em junho de 2007, na Fazenda Tamanduá pertencente a EMBRAPA-Hortaliças, localizada no Km 09 da BR-060, Brasília-Anápolis (15° 55' 56'' S, 48° 09' 08'' W). Ramos férteis das matrizes foram herborizados e depositados no Herbário da Universidade de Brasília sob os números de registros UB77645 e UB77646. O material vegetal foi transportado para os laboratórios de Fisiologia Vegetal e Anatomia Vegetal da Universidade de Brasília para processamento e análise. As cápsulas foram abertas e as sementes liberadas.

### **2.2 - Desinfestação e condições de inoculação de sementes**

As sementes foram lavadas em água corrente e desinfestadas em fungicida carbendazim (Derosal®), 300 mL.L<sup>-1</sup> em água, por imersão durante 24 h, seguido de álcool 70% por 1 min e solução de hipoclorito de sódio comercial a 2-2,5% contendo 300 µL de Tween 80 por 100 mL de solução durante 20 min. As sementes foram então submetidas a três lavagens com água destilada esterilizada. Este protocolo foi aplicado para todas as sementes utilizadas no presente trabalho. O número de sementes desinfestadas foi observado no 10º dia de cultura.

Em todas as fases do cultivo *in vitro*, os explantes (sementes ou partes aéreas) foram manipulados em capela de fluxo laminar e inoculados em frascos de vidro de 120 mm x 70 mm com 40 mL de meio de cultura ou em tubos de ensaio de 150 mm x 25 mm, contendo 25 mL de meio de cultura. O meio de cultura foi constituído pelos macros e micronutrientes de Murashige & Skoog (1962). O pH dos meios foi ajustado para 5,0±0,1 (meio líquido) e 5,7±0,1 (meio gelificado) antes da adição de ágar. A esterilização dos meios foi feita em autoclave a 121 °C com pressão de 104 KPa por 20 min.

As plantas cultivadas *in vitro* foram mantidas em câmara de crescimento com 27±2 °C, umidade aproximada de 80% e iluminação com lâmpadas fluorescentes com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa aproximada de 32 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

## **2.3 – Germinação *in vitro***

Visando avaliar o efeito da sacarose e da temperatura sobre a germinação e o estabelecimento das plantas foram testadas sementes armazenadas e recém coletadas.

### **2.3.1 - Diferentes temperaturas e presença ou ausência de sacarose na germinação de sementes armazenadas**

Sementes armazenadas por seis meses a 8 °C foram desinfestadas e inoculadas em frascos de vidro com meio de cultura líquido, sobre ponte de papel de filtro para germinação. O meio líquido foi acrescido ou não de 3% de sacarose. Após a inoculação, as sementes foram mantidas sob iluminação constante, com intensidade luminosa de aproximadamente  $32 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  em diferentes temperaturas: 15, 20, 25, 30 e 35 °C, em fatorial 5x2 (cinco temperaturas e duas concentrações de sacarose).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete repetições por tratamento. Cada repetição consistiu de um frasco com dez sementes. As sementes foram consideradas germinadas quando uma das partes do eixo embrionário emergiu de dentro dos envoltórios seminais (Labouriau, 1983). Os dados de germinação foram coletados a cada dois dias até 18º dia de cultivo.

### **2.3.2 - Concentração de sacarose para o estabelecimento de plantas *in vitro* a partir de sementes recém coletadas**

Como forma de avaliar a melhor concentração de sacarose no meio de cultura para promover a germinação e o crescimento das plântulas; sementes recém coletadas foram desinfestadas e inoculadas em tubos de ensaio com meio de cultura acrescido de 8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e sacarose nas concentrações de 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6%.

O número de sementes germinadas foi observado no 30º dia de cultura após a inoculação. Como anteriormente, considerou-se a semente germinada quando uma das partes do eixo embrionário emergiu de dentro dos envoltórios seminais. O teste de Tukey foi utilizado para comparar a germinabilidade em diferentes concentrações de sacarose.

A massa fresca das plântulas formadas nas diferentes concentrações de sacarose foi analisada no 30º dia de cultura após a inoculação, através da pesagem, em mg, de 10 lotes contendo 10 plântulas em cada tratamento. A análise de variância e o teste de Tukey foram realizados para comparar a média da massa fresca das plântulas formadas nas diferentes concentrações de sacarose.

O experimento foi mantido em câmara de crescimento com umidade aproximada de 80% e temperatura de  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 100 repetições em cada um dos sete tratamentos. Cada repetição consistiu de um tubo de ensaio com uma semente.

## 2.4 - Multiplicação

A parte aérea das plantas de 30 dias de cultura após a germinação asséptica foram excisadas e transferidas para o meio de multiplicação, em frascos de vidro, acrescido de 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 8 g.L<sup>-1</sup> de ágar. Foram testadas diferentes concentrações de BAP (0,0; 2,22 e 4,44 µM) em combinação com CIN (0,0; 2,32 e 4,64 µM) e três subcultivos consecutivos de 40 dias cada, dispostos no esquema fatorial 3x3x3. Em todos os tratamentos, exceto no controle sem fitorreguladores, foi adicionado 1,48 µM de AIB.

As 135 partes aéreas foram distribuídas nos nove diferentes tratamentos (15 por tratamento). A identificação de cada frasco constou de dois números: o primeiro relativo ao tratamento e o segundo o número que identifica o indivíduo (ex. 1-1: tratamento um planta um; 9-135: tratamento nove planta centro e trinta e cinco), conforme lista de tratamento na tabela abaixo.

**Tabela 1.** Diferentes tratamentos dispostos em fatorial 3x3x3 na multiplicação de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f.

Trat.	BAP (µM)	CIN (µM)	AIB (µM)
1	0,00	0,00	0,00
2	0,00	2,32	1,48
3	0,00	4,64	1,48
4	2,22	0,00	1,48
5	4,44	0,00	1,48
6	2,22	2,32	1,48
7	2,22	4,64	1,48
8	4,44	2,32	1,48
9	4,44	4,64	1,48

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quinze repetições. Cada repetição consistiu de um frasco com uma planta. Em cada subcultivo foram avaliados o número e o comprimento dos brotos formados. Após as primeiras análises verificou-se heterogeneidade da variância havendo necessidade de transformação dos dados, a transformação estabilizadora da variância encontrada foi  $(x+1)^{0,5}$ .

## 2.5 - Alongamento

Brotos resultantes da etapa de multiplicação foram transferidos para frascos com meio de cultura, ao qual foi acrescido de 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 8 g.L<sup>-1</sup> de agar. O ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) foi adicionado após a autoclavagem através da filtração estéril com membranas Millipore® 0,2 µm, combinado com cinetina (CIN) e ácido indol-butílico (AIB) em cinco diferentes tratamentos, nas concentrações descritas na tabela abaixo:

**Tabela 2.** Diferentes tratamentos no alongamento dos brotos de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f.

Trat.	AG3 (µM)	CIN (µM)	AIB (µM)
1	0,00	0,00	0,00
2	0,00	2,32	2,46
3	5,77	2,32	2,46
4	11,54	2,32	2,46
5	17,32	2,32	2,46

A identificação de cada frasco de vidro contendo os brotos seguiu a mesma metodologia descrita no experimento anterior (multiplicação).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quinze repetições por tratamento. Cada repetição consistiu de um frasco com um broto. Os brotos foram transferidos (sem excisão) para meio de cultura novo a cada 30 dias de cultivo. Foram avaliados os aumentos do número de folhas e o alongamento dos brotos aos 30, 60 e 90 dias de cultivo.

## 2.6 - Enraizamento *ex vitro* e aclimatização

O enraizamento e a aclimatização foram testados na sala de cultura *in vitro* e em casa de vegetação. Os brotos produzidos durante a fase de multiplicação foram lavados em água corrente, para eliminar os resíduos de meio de cultura. Após serem isolados, suas bases (cerca de 2 mm) foram tratadas com gel enraizante Selagel® (com 1.000 ppm de AIB) e com AIB em pó a 1000 ppm (0,1 g AIB com 100 g de talco neutro). A mistura de AIB e talco foi homogeneizada com álcool comercial 92°, formando uma pasta, a qual foi deixada em temperatura ambiente até a total

evaporação com o retorno ao estado de pó. O controle foi testado utilizando os mesmos procedimentos excluindo o AIB e o gel.

Após os tratamentos, os brotos foram plantados em copos plásticos de 500 mL, previamente perfurados, contendo vermiculita e latossolo vermelho (1/3 superior do copo com vermiculita e os 2/3 inferiores com latossolo vermelho coletado até 20 cm de profundidade nas coordenadas geográficas: 15° 55' 56'' S, 48° 09' 08'' W), autoclavadas e umedecidas com água destilada estéril.

Os copos contendo os brotos cultivados em sala de cultura foram cobertos com sacos plásticos fixados com liga de elásticos. Os sacos foram retirados diariamente por cinco dias, até serem retirados totalmente. Os brotos cultivados na casa de vegetação foram transferidos imediatamente após o plantio.

As condições na sala de cultura foram citadas anteriormente. Na casa de vegetação as condições foram: temperatura do ambiente 40 °C, umidade relativa 95%, intensidade luminosa 40  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 25 repetições. Cada repetição consistiu de um copo plástico com uma plântula. Os dados referentes ao enraizamento (formação de raízes adventícias, secundárias e terciárias) e a aclimatização foram coletados 30 dias após o plantio.

## **2.7 - Aclimação em viveiro**

Com 120 dias de cultivo em casa de vegetação, as plantas (n=20) aclimatizadas foram transferidas para vasos de 1384 mL, contendo terra do cerrado. Os vasos foram dispostos em local sombreado naturalmente (por árvores) e as plantas regadas uma vez ao dia. A sobrevivência foi observada no 30<sup>o</sup> dia de cultivo.

## **2.8 - Análise anatômica**

Amostras de 5 mm da base dos brotos com as raízes adventícias foram preparadas fixadas em álcool 70% ou em solução fixadora composta de glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (4%) e tampão cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,1) por 24 h sob vácuo e lavadas três vezes, 1h cada

lavagem no mesmo tampão. Subsequentemente as amostras fixadas em glutaraldeído foram desidratadas em série alcoólica crescente, infiltrada e incluídas em historresina (Technovit 7100).

Cortes transversais (7-10  $\mu\text{m}$ ) foram obtidos em micrótomo rotatório Leica modelo RM 2145, distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa histológica a 45 °C. Os cortes foram corados com Safranina e Azul de Toluidina e montados em Entellan.

As amostras fixadas em álcool 70% foram seccionadas com o auxílio de micrótomo de bancada e lâmina de barbear. Os cortes foram clarificados em solução de hipoclorito de sódio 0,25% durante 15 min e hipoclorito de sódio 1,25% por 10 min, sendo lavados em água destilada, desidratados em gradiente etanólico, corados com Azul de Alcian e Safranina (4:1) e montados em lâmina com verniz vitral incolor (Paiva *et al.*, 2006). Estes cortes foram comparados com aqueles obtidos mediante inclusão em historresina e os melhores resultados foram registrados em fotomicroscópio Zeiss modelo Axioskop acoplado ao sistema digital de captura de imagens com o Software ImagePro 4.0.

## **2.9 - Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância (Anova) e ao teste LSD (Least Square Difference), utilizando-se os Softwares STATISTICA 6.0 e SISVAR.

## **3 – RESULTADOS**

### **3.1 - Germinação**

No 10º dia de cultura, tanto as sementes conservadas a 8 °C e inoculadas em meio líquido, quanto às recém coletadas e inoculadas em meio gelificado apresentaram taxa de desinfestação acima de 95%.

Sementes de *Vellozia squamata* Pohl armazenadas a 8 °C e inoculadas em meio de cultura, foram submetidas a diferentes temperaturas, na presença ou ausência de sacarose. A germinação estabilizou-se no 18º dia de cultura.

Verificou-se pela análise de variância o efeito significativo das diferentes temperaturas na germinabilidade de *V. flavicans*, enquanto que a concentração de sacarose e a interação temperatura e sacarose não se mostraram significativas.

De maneira geral, as temperaturas entre 25 °C e 35 °C, com ou sem sacarose, foram mais favoráveis a germinabilidade e não diferiram estatisticamente ( $p < 0.01$ ). O maior percentual (51%) foi observado a 35 °C com 3% de sacarose (Tabela 3).

**Tabela 3.** Germinabilidade (%) de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. armazenadas por 6 meses a 8 °C e cultivadas em meio com ou sem sacarose e sob diferentes temperaturas. Observações efetuadas no 18º dia de cultivo *in vitro*.

Temperatura (°C)	Sacarose (%)	Germinadas (%)
15	0	4,28cd
15	3	0,00d
20	0	5,17cd
20	3	8,57cd
25	0	38,57ab
25	3	20,00bc
30	0	41,42a
30	3	37,14ab
35	0	48,57a
35	3	51,42a
n=70		

Porcentagens seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD ( $p < 0,01$ ).

Para favorecer o estabelecimento das plantas *in vitro*, sementes de cápsulas recém coletadas foram desinfestadas e inoculadas em tubos de ensaio com meio de cultura e sacarose nas concentrações de 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6%. Verificou-se que aumento da concentração de sacarose diminuiu a porcentagem de germinação (Tabela 4).

A maior germinabilidade, 92%, foi observada no meio de cultura sem sacarose. Entretanto, concentrações de 0 a 3%, não diferem significativamente ( $p < 0,01$ ) e propiciaram percentuais acima de 70%. É interessante destacar que concentrações acima de 3% de sacarose diminuíram a germinabilidade (12%).

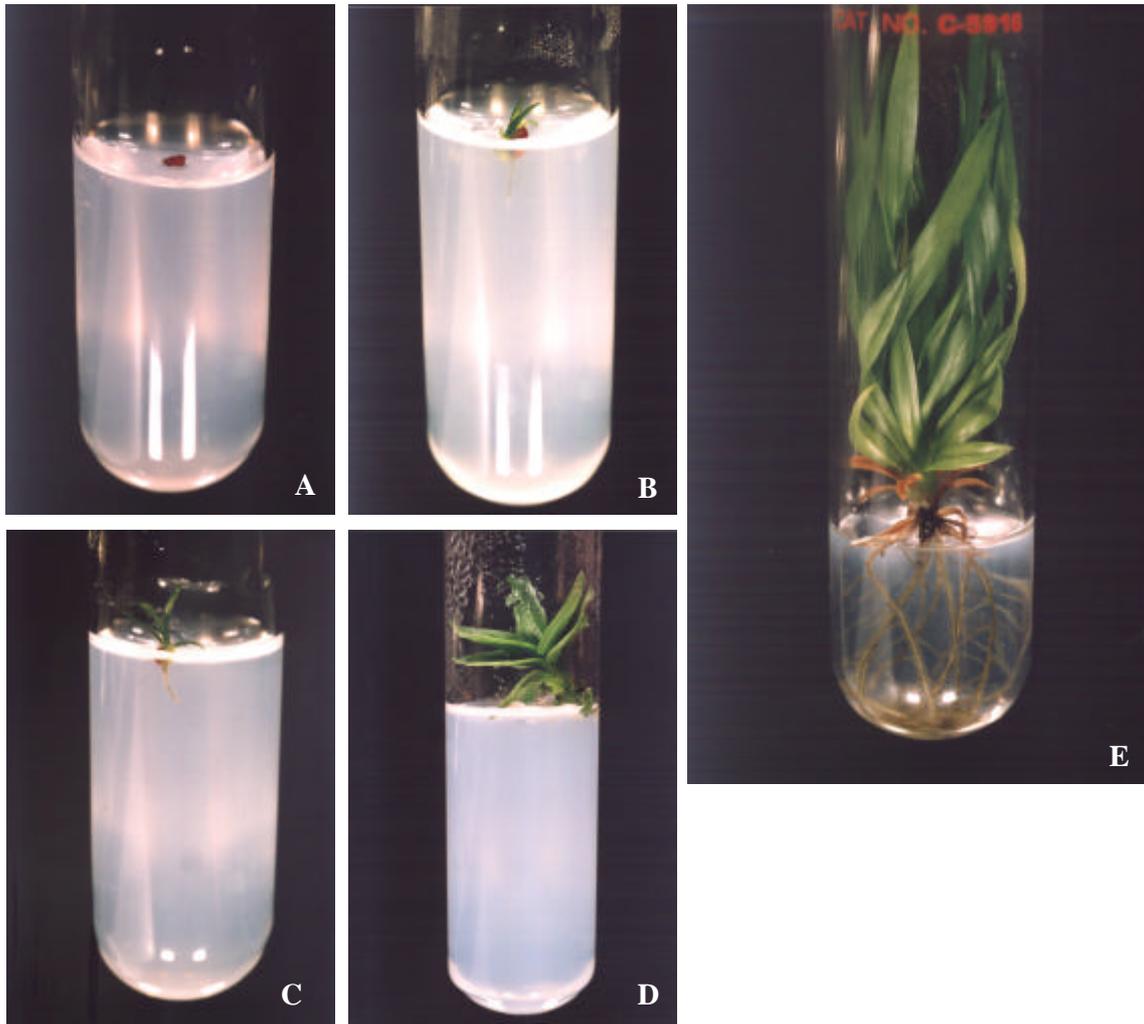
Assim como na germinabilidade, o aumento da concentração de sacarose diminuiu massa fresca das plantas (tabela 4). A maior média massa fresca foi observada no meio de cultura sem sacarose,  $120 \pm 10$  mg, embora concentrações de 0 a 2% não sejam significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ). Plantas cultivadas em concentrações acima de 3% não produziram massa fresca suficiente para serem aferidas.

**Tabela 4.** Germinabilidade (%) e massa fresca de *Vellozia. flavicans* Mart. ex Schult. f. recém coletadas e inoculadas em meio MS com diferentes concentrações de sacarose a 27±2 °C.

Concentração de sacarose (%)	Germinadas (%)	Massa fresca (mg)
		Média±erro padrão
0	92,22 <b>a</b>	120 ±10 <b>a</b>
1	87,00 <b>ab</b>	120 ±10 <b>a</b>
2	83,00 <b>ab</b>	80 ±0 <b>ab</b>
3	74,44 <b>b</b>	60 ±10 <b>b</b>
4	12,50 <b>c</b>	
5	11,66 <b>c</b>	
6	10,00 <b>c</b>	
n=100		

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste LSD ( $p<0,01$ ).

A Figura 3 ilustra a germinação e o desenvolvimento da plântula e planta jovem de *V. flavicans*. A germinação ocorreu a partir do 6º dia de cultura (Fig. 3A-B) e prossegue até o 18º dia, quando estabiliza. A parte aérea se exteriorizou entre o 10º e 22º dia de cultura (Fig. 3B). Aos 60 dias de cultura os primeiros eofilos já são lanceolados e apresentam filotaxia alterna (Fig. 3C). No 120º dia de cultura (Fig. 3E), a planta jovem apresentou sistema radicular bem desenvolvido com “muitas” raízes adventícias e laterais e parte aérea com entrenós curtos e folhas expandidas.



**Figura 3.** *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. cultivada em meio de cultura MS modificado. A) Semente recém inoculada. B) Plântula aos 15 dias de cultivo. C) Plântula aos 30 dias de cultivo. D) Planta aos 60 dias de cultivo. E) Planta aos 120 dias de cultivo: folhas vigorosas e raízes bem desenvolvidas. .

### 3.2 - Multiplicação e subcultivos

A parte aérea das plantas com 30 dias de cultura, produzidas na fase anterior, foram excisadas e transferidas para o meio de multiplicação contendo diferentes concentrações de BAP e CIN em fatorial 3x3x3. As Tabelas 5 e 6 apresentam a médias ( $\pm$  erro padrão) do número e comprimento dos brotos formados nos diferentes tratamentos, em cada subcultivo.

Pela análise de variância verificou-se que as concentrações de BAP, CIN e subcultivos influenciaram significativamente no número de brotos de *V. flavicans*. No comprimento dos brotos houve efeito significativo para as diferentes concentrações de BAP e subcultivos. Foram observadas também interações duplas e triplas, mas não foram significativas para o número e comprimento dos brotos formados.

As maiores médias de número de brotos, 7,2 ( $\pm 1,4$ ) e 6,3 ( $\pm 0,8$ ) foram obtidas no 3º subcultivo em 2,22  $\mu\text{M}$  e em 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP, respectivamente, indicando que o aumento da concentração de BAP, isolada da CIN, otimiza a formação dos brotos (Tabela 5).

**Tabela 5.** Número de brotos em *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. cultivada em meio de cultura contendo de 6-benzilaminopurina (BAP) e 6-furfurillaminopurina ou cinetina (CIN), em diferentes concentrações, em três subcultivos sucessivos de 40 dias cada. Média  $\pm$  erro padrão.

Trat.	BAP ( $\mu\text{M}$ )	CIN ( $\mu\text{M}$ )	AIB ( $\mu\text{M}$ )	Sub 1	Sub 2	Sub 3
1	0,00	0,00	0,00	1,0 $\pm$ 0,0 <b>bb</b>	1,9 $\pm$ 0,2 <b>abB</b>	3,5 $\pm$ 0,4 <b>abA</b>
2	0,00	2,32	1,48	1,2 $\pm$ 0,1 <b>abB</b>	1,5 $\pm$ 0,2 <b>bB</b>	3,8 $\pm$ 0,8 <b>abA</b>
3	0,00	4,64	1,48	1,6 $\pm$ 0,2 <b>abB</b>	2,0 $\pm$ 0,2 <b>abB</b>	4,7 $\pm$ 0,9 <b>abA</b>
4	2,22	0,00	1,48	1,7 $\pm$ 0,1 <b>aB</b>	2,3 $\pm$ 0,3 <b>abB</b>	6,3 $\pm$ 0,8 <b>abA</b>
5	4,44	0,00	1,48	1,6 $\pm$ 0,2 <b>abB</b>	3,4 $\pm$ 0,8 <b>aB</b>	7,2 $\pm$ 1,4 <b>aA</b>
6	2,22	2,32	1,48	1,3 $\pm$ 0,1 <b>abB</b>	2,3 $\pm$ 0,3 <b>abAB</b>	3,1 $\pm$ 0,4 <b>bA</b>
7	2,22	4,64	1,48	1,4 $\pm$ 0,1 <b>abB</b>	3,0 $\pm$ 0,4 <b>abAB</b>	4,3 $\pm$ 0,6 <b>abA</b>
8	4,44	2,32	1,48	1,4 $\pm$ 0,1 <b>abB</b>	2,1 $\pm$ 0,3 <b>abAB</b>	3,6 $\pm$ 0,7 <b>abA</b>
9	4,44	4,64	1,48	1,7 $\pm$ 0,2 <b>aA</b>	3,2 $\pm$ 0,6 <b>abA</b>	5,6 $\pm$ 1,7 <b>abA</b>

n=15

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste LSD ( $p < 0,01$ ) com os dados transformados  $(x+1)^{0,5}$ .

Pela análise de variância houve efeito significativo do BAP e do subcultivo no comprimento dos brotos de *V. flavicans*.

A Tabela 6 mostra a altura dos brotos em *V. flavicans*. Observa-se que não houve diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. As maiores médias 2,7±0,2 em 4,44 µM de BAP e 2,7±0,3 em 4,44 µM de BAP com 4,64 µM de CIN foram observadas no segundo e no terceiro subcultivo, respectivamente.

Na Figura 4 pode ser observado o desenvolvimento e a multibrotação das plantas de *V. flavicans* cultivadas *in vitro* em meio MS modificado, as plantas aos 30 dias depois de transferida para o meio de multiplicação contendo 2,22 µM BAP combinado com 4,64 µM de CIN e 1,48 µM de AIB (Fig. 4A), emitindo multibrotações (Fig. 4B) e após 120 dias de cultivo a planta está bem desenvolvida apresentando brotos vigoroso (Fig. 4C).

**Tabela 6.** Comprimento dos brotos (cm) em *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. cultivada em meio de cultura contendo de 6-benzilaminopurina (BAP) e 6-furfurillaminopurina ou cinetina (CIN), em diferentes concentrações, em três subcultivos sucessivos de 40 dias cada. Média ± erro padrão.

Trat.	BAP (µM)	CIN (µM)	AIB (µM)	Sub 1	Sub 2	Sub 3
1	0,00	0,00	0,00	1,6±0.1 <b>abcA</b>	2,0±0.2 <b>abcA</b>	1,7±0.0 <b>ba</b>
2	0,00	2,32	1,48	1,4±0.1 <b>cA</b>	1,9±0.2 <b>abcA</b>	1,9±0.2 <b>ba</b>
3	0,00	4,64	1,48	1,5±0.1 <b>bcA</b>	2,0±0.2 <b>abcA</b>	1,9±0.1 <b>ba</b>
4	2,22	0,00	1,48	1,7±0.1 <b>abcA</b>	2,2±0.2 <b>abcA</b>	2,0±0.1 <b>abA</b>
5	4,44	0,00	1,48	1,9±0.1 <b>abA</b>	2,7±0.2 <b>aA</b>	2,0±0.1 <b>abA</b>
6	2,22	2,32	1,48	1,7±0.1 <b>abcA</b>	2,0±0.1 <b>abcA</b>	1,9±0.1 <b>ba</b>
7	2,22	4,64	1,48	1,7±0.1 <b>abcA</b>	1,6±0.2 <b>cA</b>	1,7±0.1 <b>ba</b>
8	4,44	2,32	1,48	2,0±0.1 <b>aA</b>	2,6±0.3 <b>abA</b>	2,1±0.2 <b>abA</b>
9	4,44	4,64	1,48	1,9±0.1 <b>abcA</b>	2,3±0.2 <b>abcA</b>	2,7±0.3 <b>aA</b>
n=15						

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste LSD ( $p<0,01$ ) com os dados transformados  $(x+1)^{0,5}$ .

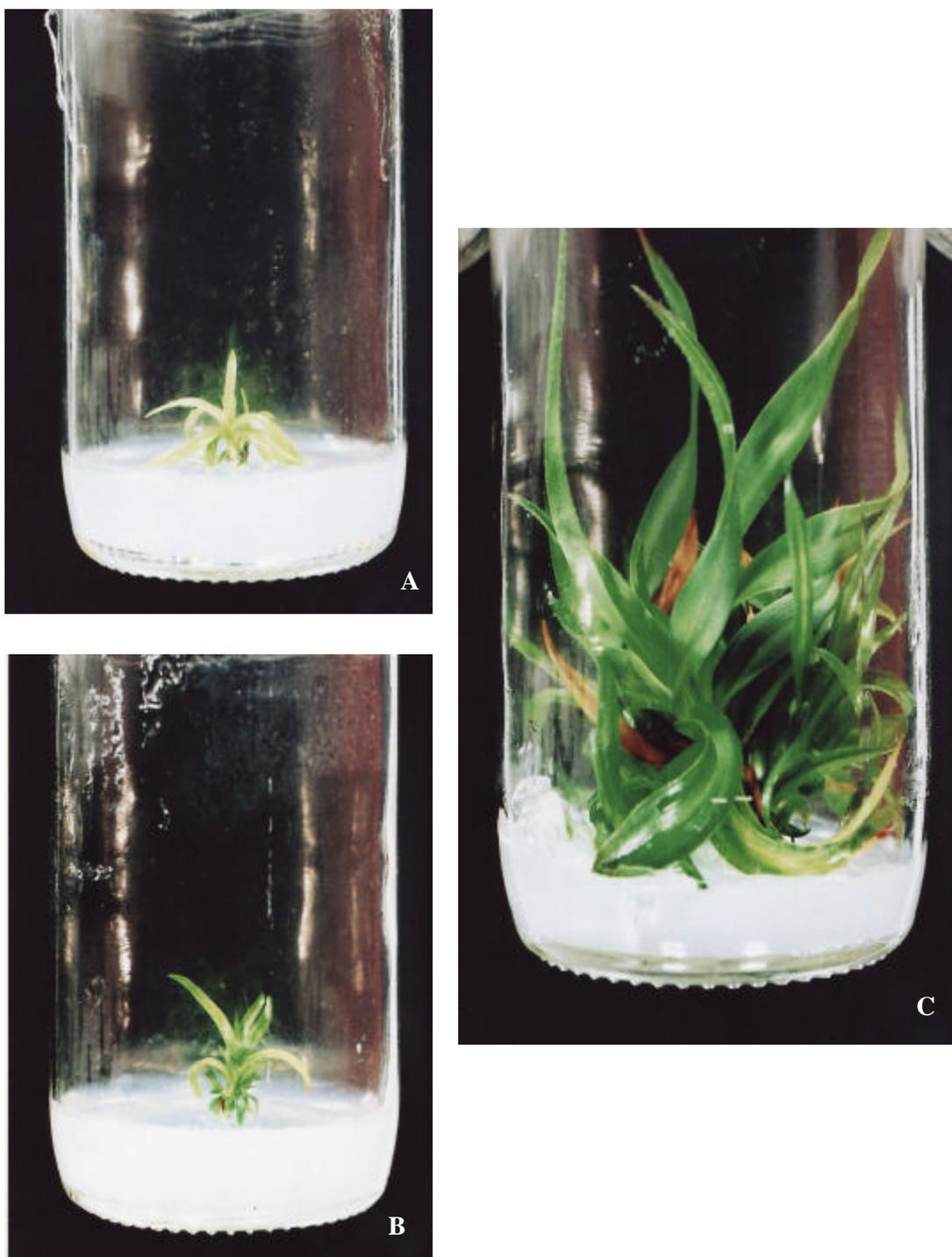
Na tabela 7 pode ser observado que nos diferentes genótipos de *V. flavicans* o número médio de brotos formados em 9 diferentes tratamentos, após 120 dias de cultivo (em 3 subcultivos de 40 dias cada), observa-se no mesmo tratamento (9) a maior média de brotos formados 12,3 (planta 128), e plantas que formaram somente um broto (122, 127, 130 e 135). Para o comprimento dos brotos a melhor resposta foi dada pela planta 15 com 5,9 cm (Tabela 8), mas com uma média baixa (1,7) de brotos formados.

Tabela 7. Resposta dos diferentes genótipos de *V. flavicans* no número médio de brotos em nove tratamentos após 120 dias de cultivo (de 40 dias cada).

planta	brotos	trat	planta	brotos	trat																					
1	1	2,7b	2	16	1,3e	3	31	1,7g	4	46	1,7j	5	61	2,7d	6	76	3,0e	7	91	1,0i	8	106	1,0i	9	121	2,0g
1	2	1,0f	2	17	2,7b	3	32	1,7g	4	47	2,0i	5	62	1,3g	6	77	1,3h	7	92	2,0j	8	107	1,5h	9	122	1,0j
1	3	1,7d	2	18	1,3e	3	33	1,3h	4	48	3,5f	5	63	1,3g	6	78	3,0e	7	93	2,7h	8	108	1,7g	9	123	1,7h
1	4	1,7d	2	19	2,0d	3	34	1,0i	4	49	3,0h	5	64	3,3c	6	79	2,7f	7	94	5,3e	8	109	1,0i	9	124	6,3b
1	5	2,0e	2	20	2,0d	3	35	2,7d	4	50	2,3h	5	65	2,0e	6	80	3,0e	7	95	2,0j	8	110	2,0f	9	125	1,0j
1	6	3,0a	2	21	1,0f	3	36	2,0f	4	51	3,3g	5	66	1,0h	6	81	3,0e	7	96	1,0i	8	111	3,0d	9	126	2,7e
1	7	1,7d	2	22	1,0f	3	37	1,3h	4	52	5,0d	5	67	1,0h	6	82	4,3c	7	97	2,3i	8	112	1,3h	9	127	1,0j
1	8	1,7d	2	23	6,0a	3	38	2,3e	4	53	3,3g	5	68	3,3c	6	83	2,7f	7	98	1,7h	8	113	1,7g	9	128	12,3a
1	9	2,0e	2	24	2,3c	3	39	1,0i	4	54	6,0b	5	69	1,0h	6	84	1,7g	7	99	7,7d	8	114	1,0i	9	129	6,0e
1	10	1,5e	2	25	1,0f	3	40	1,3h	4	55	3,7e	5	70	2,0e	6	85	5,0b	7	100	11,0a	8	115	2,7e	9	130	1,0j
1	11	3,0a	2	26	2,0d	3	41	5,0b	4	56	5,7e	5	71	1,7f	6	86	1,0i	7	101	4,0f	8	116	3,3c	9	131	1,3i
1	12	1,7d	2	27	2,3c	3	42	5,0b	4	57	2,7i	5	72	1,7f	6	87	3,7d	7	102	3,3g	8	117	2,7e	9	132	5,0d
1	13	3,0a	2	28	2,0d	3	43	5,7a	4	58	6,3a	5	73	4,3a	6	88	5,3a	7	103	8,3b	8	118	5,3a	9	133	2,3f
1	14	1,0f	2	29	1,0f	3	44	3,0e	4	59	2,0i	5	74	4,0b	6	89	1,0i	7	104	8,0e	8	119	5,0b	9	134	6,3b
1	15	1,7d	2	30	1,0f	3	45	5,7a	4	60	2,3h	5	75	1,7f	6	90	1,0i	7	105	1,0i	8	120	1,0i	9	135	1,0j

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste LSD ( $p < 0,01$ ).





**Figura 4.** *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. cultivada no meio de multiplicação contendo 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 2,22 µM BAP combinado com 4,64 µM de CIN e 1,48 µM de AIB. A) Planta aos 30 dias de cultivo. B) Planta aos 30 dias de cultivo com brotos C) Planta aos 120 dias de cultivo.

### 3.3 - Alongamento

A fim de estimular o alongamento de *V. flavicans*, resultantes da fase de multibrotação, os brotos foram isolados e colocados em meio contendo diferentes concentrações de AG<sub>3</sub> combinados com CIN e AIB (Tabela 9).

A análise de variância mostrou que não houve efeito significativo das diferentes concentrações de AG<sub>3</sub> combinada com CIN e AIB no comprimento e no número de folhas formadas nos brotos de *V. flavicans*, o efeito significativo foi observado somente no subcultivo.

Nas tabelas 9 e 10, observa-se que não houve diferença estatística entre os diferentes tratamentos dentro da mesma cultura para o comprimento e número de folhas formadas. O comprimento e número de folhas dos brotos aumentaram nas culturas sucessivas, e a maior média foi observada no tratamento controle (3,4±0,1), sem a adição de fitorreguladores na terceira cultura.

**Tabela 9.** Comprimento médio dos brotos (cm) em *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. cultivada em meio de cultura contendo 6-furfurillaminopurina ou cinetina (CIN), ácido 3-indolibutílico (AIB) e ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) em diferentes concentrações, em três culturas sucessivas de 30 dias cada. Média ± erro padrão.

Trat.	AG <sub>3</sub> (μM)	CIN (μM)	AIB (μM)	Comprimento dos brotos (cm)		
				Sub1	Sub2	Sub3
1	0,00	0,00	0,00	1,2±0,0aC	2,4±0,1aB	3,4±0,1aA
2	0,00	2,32	2,46	1,1±0,0aC	2,3±0,1aB	3,0±0,2aA
3	5,77	2,32	2,46	1,1±0,0aB	2,6±0,1aB	2,7±0,1aA
4	11,54	2,32	2,46	1,2±0,0aC	2,1±0,1aB	3,0±0,2aA
5	17,32	2,32	2,46	1,3±0,0aB	2,5±0,2aA	2,9±0,2aA
n=15						

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste LSD ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 10.** Número médio de folhas formadas em *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. cultivada em meio de cultura contendo 6-furfurillaminopurina ou cinetina (CIN), ácido 3-indolibutílico (AIB) e ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) em diferentes concentrações, em três subcultivos sucessivos de 30 dias cada. Média ± erro padrão.

Trat.	AG <sub>3</sub> (µM)	CIN (µM)	AIB (µM)	N <sup>o</sup> de folhas		
				Sub1	Sub2	Sub3
1	0,00	0,00	0,00	7,9±0,2aC	12,1±0,5aB	16,8±0,8aA
2	0,00	2,32	2,46	8,1±0,4aC	10,4±0,4aB	13,0±0,6aA
3	5,77	2,32	2,46	7,9±0,4aC	11,8±0,7aB	14,3±0,7aA
4	11,54	2,32	2,46	8,4±0,3aC	11,6±0,5aB	16,6±0,4aA
5	17,32	2,32	2,46	8,1±0,4aB	11,8±0,7aA	14,2±0,8abA

n=15

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste LSD ( $p < 0,01$ ).

### 3.4 - Enraizamento *ex vitro*, aclimatização e aclimação

Para promover o enraizamento e aclimatização dos brotos de *V. flavicans* foram testados o gel enraizante Selagel<sup>®</sup> e AIB a 1000 ppm em sala de cultivo e em casa de vegetação. A Figura 5 ilustra o processo de aclimatização e aclimação da plantas de *V. flavicans*.

Os brotos cultivados em sala de cultivo apresentaram taxa de mortalidade de 98% no 15<sup>o</sup> dia após a retirada completa dos sacos plásticos. Na tabela 11, observam-se os resultados em casa de vegetação. A maior porcentagem de plantas enraizada e aclimatizada foi obtidas com o gel enraizador (56%), embora não haja diferença estatística com o controle (52%). As plantas aclimatadas em viveiro apresentaram 100 % de sobrevivência no 30<sup>o</sup> dia de cultivo (Fig. 5D).

**Tabela 11.** Enraizamento/Aclimatização (%) e média ( $\pm$  erro padrão) do número de raízes formadas em *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. em casa de vegetação cultivada em vermiculita e latossolo vermelho com 30 dias de cultivo.

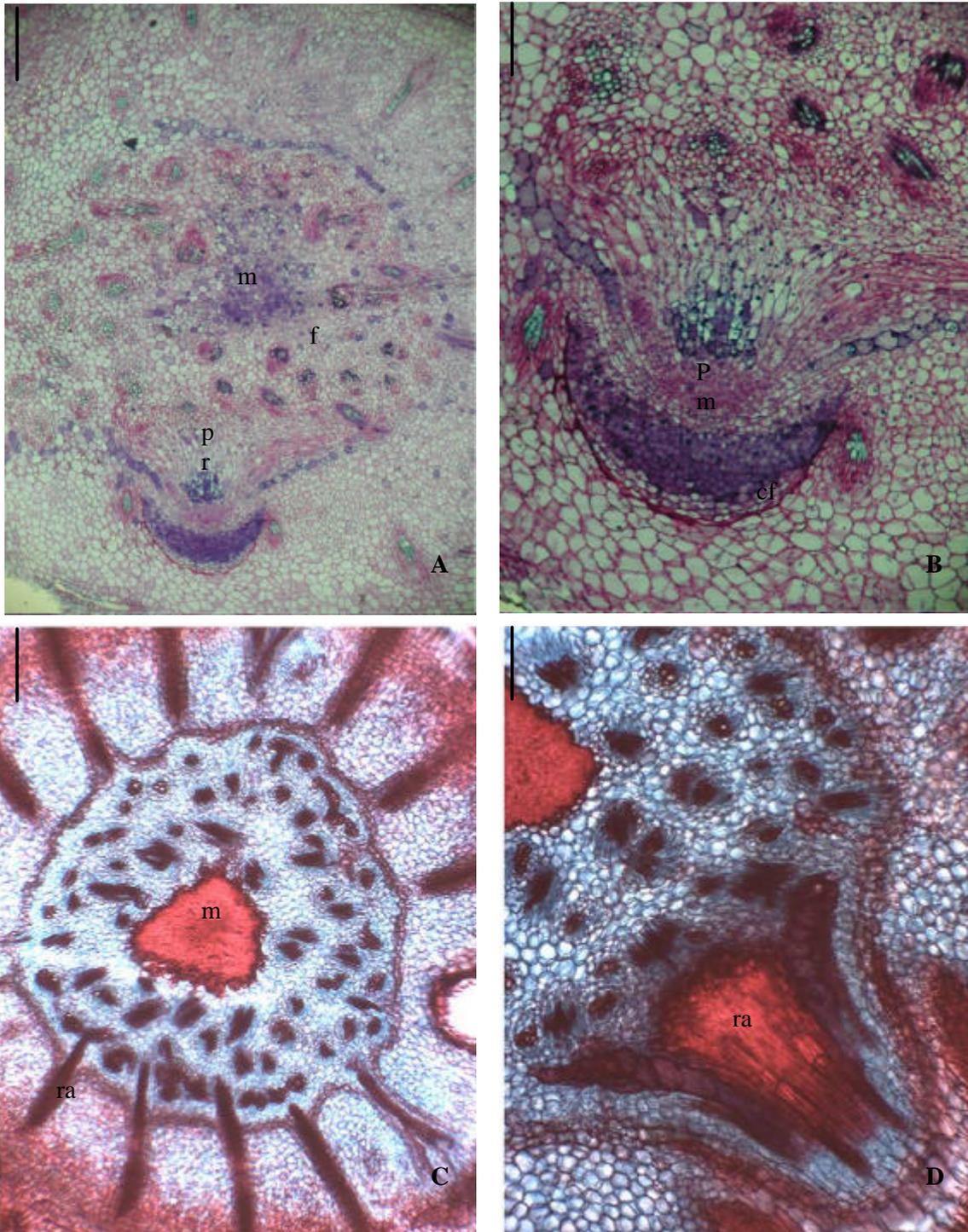
Tratamento	Enraizamento/Aclimatização (%)	Raízes primárias	Raízes secundárias	Raízes terciárias
Controle	52a	2,1 $\pm$ 0,2a	13,0 $\pm$ 5,9a	17,0 $\pm$ 0,0
AIB	40b	1,3 $\pm$ 0,1b	9,0 $\pm$ 5,0a	-
Gel	56a	2,5 $\pm$ 0,3a	10,1 $\pm$ 5,9a	-
n=25				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste LSD ( $p < 0,01$ ).

Pela análise anatômica verifica-se que as raízes adventícias se diferenciam na região do periciclo/endoderme e nos feixes vasculares, indicando que a vascularização da raiz está conectada com a do caule (Fig. 6).



**Figuras 5.** Plantas de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. aclimatizadas e aclimatadas. A) Plantas com 30 dias na casa de vegetação, B) Planta mostrando sistema radicular bem desenvolvido após 30 dias na casa de vegetação, C) Plantas mostrando as raízes após 90 dias na casa de vegetação, D) Plantas aclimatadas em viveiro após 180 dias na casa de vegetação.



**Figuras 6.** Cortes transversais do caule de plantas aclimatizadas de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. mostrando o desenvolvimento de raízes adventícias. A) Aspecto geral da base do caule, com a diferenciação de um primórdio radicular (barra 200 $\mu$ m). B) Detalhe do primórdio radicular com todas as regiões meristemáticas típicas (barra 100 $\mu$ m). C) Raízes formadas na região do periciclo/endoderme e feixes vasculares (barra 200 $\mu$ m). D) Detalhe da conexão do feixe vascular da raiz com o caule (barra 100 $\mu$ m). m=medula, f=feixe vascular, pr=primórdio de raiz adventícia, pm=promeristema, cf=coifa, ra=raiz adventícia.

## 4 - DISCUSSÃO

### 4.1 - Restrições à propagação e cultivo por métodos convencionais de Velloziaceae

Muitas espécies de Velloziaceae apresentam potencial ornamental, pela arquitetura exótica do seu caule ou pela beleza de suas flores. Apesar deste potencial ser citado na literatura desde 1961 em diversos trabalhos, entre eles, Strang (1961 *in* Menezes 1984) Menezes (1970; 1984), Mercier & Guerreiro Filho (1989), Silva (1991) e Almeida *et al.* (1998), não foi encontrado nenhum visando à produção comercial de mudas para as espécies da família.

Para Ayensu (1973) as sementes de *Velloziaceae* germinam com facilidade e o problema crucial para a produção de mudas não é a germinabilidade e sim a sobrevivência da plântula até a maturidade. É importante destacar que, em todos os trabalhos, as altas germinabilidades foram obtidas em laboratório, sob temperaturas e iluminação controladas, indicando que a produção de mudas a partir de sementes em condições naturais ou em viveiro provavelmente fica restrita a um curto período do ano.

Outro fator que dificulta a produção de mudas de *V. flavicans* a partir de sementes é a possível perda da viabilidade com o armazenamento, uma vez que há uma diferença significativa na perda do percentual de germinação *in vitro* das sementes recém coletadas (92,2%), quando comparadas com as armazenadas por seis meses (51,4%). Ayensu (1973) obteve a 30 °C, para sementes de 25 espécies de Velloziaceae com quatro meses de coletadas, percentuais de germinação variando entre 50% e 100%. A repetição do teste de germinação seis meses mais tarde com sementes do mesmo lote mostrou que houve perda de 60% da viabilidade.

Sementes recém coletadas de *V. flavicans* foram colocadas para germinar, no mês de agosto de 2007 em ambiente sombreado, em potes de 500 mL contendo três substratos diferentes (areia, vermiculita e latossolo vermelho) irrigadas uma vez ao dia. Após 20 dias não houve a emissão de raiz primária, ou de qualquer parte do embrião (Freitas-Neto, dados não publicados). Resultados semelhantes foram obtidos no viveiro da Universidade de Brasília-UnB, onde sementes de canela-de-ema plantadas sob condições naturais também não germinaram (Sr. Florisvaldo, comunicação pessoal). Confirmando que a germinação de *V. flavicans* fora do laboratório deve ser melhor estudada.

Plantas com 30 dias depois de germinadas *in vitro* foram transferidas para a casa de vegetação em potes de 500 mL com latossolo vermelho, tal alternativa também não se mostrou viável para a produção de mudas em função da baixa taxa de sobrevivência das plantas, que pode estar associada ao reduzido tamanho das mudas favorecendo injúrias durante o manuseio (Freitas-Neto, dados não publicados), ou as modificações morfo-anatômicas sofridas durante o período *in vitro* (capítulo II).

Foram realizados testes preliminares com o objetivo de produzir mudas de *V. flavicans* por estaquia, então, segmentos do caule de canela-de-ema foram colocados para enraizar diretamente no solo de cerrado sob condições naturais (20 segmentos com a base dos caules tratados com AIB 1000ppm e 20 segmentos controle), irrigados diariamente. Após 30 dias do plantio não se verificou a emissão de raízes adventícias em nenhuma estaca (Freitas-Neto, dados não publicados). Ribeiro *et al.* (1996) também não alcançou resultados iniciais satisfatórios na reprodução por estaquia de espécies frutíferas do Cerrado como: pequi, araticum, mangaba e cagaita tratadas com AIA e AIB. Tais resultados indicam a necessidade de mais estudos para verificar a viabilidade do uso de estaquia na produção de mudas de *V. flavicans*.

Diante do exposto, uma alternativa viável para a propagação em larga escala de *V. flavicans* é utilizar as técnicas da cultura de tecidos que possibilitam uma grande produção de mudas saudáveis e uniformes.

## 4.2 - Germinação

A grande dificuldade na desinfestação de explantes com grau elevado de infestação endógena e exógena por microorganismos, oriundos de indivíduos adultos crescendo em condições naturais, pode inviabilizar o estabelecimento *in vitro*. Para plantas do Cerrado crescendo no campo os tratamentos de desinfestação são normalmente insuficientes e a germinação *in vitro* pode se apresentar como uma alternativa para a propagação de nativas deste Bioma (Melo *et al.*, 2008).

Levando em consideração os aspectos acima mencionados, escolheu-se a germinação asséptica das sementes como fonte de explantes para a micropropagação de *V. flavicans*, como em outras espécies nativas do Cerrado brasileiro (Silva *et al.*, 2008; Bucher, 2002; Grigoletto, 1997). As sementes de *V. flavicans* apresentaram taxas de desinfestação acima de 95% no 10º dia de cultura. Silva (2008) e Bucher (2002) relatam taxas de descontaminação das sementes de *Alibertia edulis* Rich e *Brosimum Glaudichaudii*, respectivamente, próximas às obtidas para *V. flavicans*, sem utilizar fungicida.

A germinação abrange um conjunto de eventos que se inicia com a embebição da semente e termina com a emergência de parte do eixo embrionário de dentro dos envoltórios seminais (Labouriau, 1983; Bewley & Black, 1994; Bewley, 1997).

*V. flavicans* começou a emitir a raiz primária a partir do 6º dia nas temperaturas de 30 e 35 °C estabilizando a partir do 18º dia. Este resultado corrobora com os obtidos por Ayenso (1973), que fez testes de germinação em 25 espécies de *Velloziaceae* a temperatura de 30±1 °C, e observou a emissão da raiz primária em aproximadamente 10 dias.

Nesta pesquisa, sementes recém coletadas de *V. flavicans* apresentaram *in vitro* germinabilidade de 92,2% a 27 ± 2 sob iluminação. Sob iluminação constante, Oliveira & Borghetti (2003) observaram na espécie em estudo porcentagens maiores que 70% entre 22 e 38 °C, enquanto Garcia & Diniz (2003) obtiveram, a 35 °C, percentuais de germinação superiores a 80% para três espécies de *Vellozia*. Estes dados indicam que as sementes de *Vellozia* apresentam elevadas geminabilidade.

Segundo Bewley & Black (1994), em função da baixa disponibilidade de reservas, sementes pequenas geralmente germinam na camada superficial do solo para se estabelecerem rapidamente. Durante a fase de estabelecimento *in vitro* utilizando sementes, o objetivo é de obter plantas vigorosas que produzam explantes para a fase de multiplicação, mesmo sob baixa intensidade luminosa, que resulta no desenvolvimento heterotrófico (Campostrini & Otoni, 1996; Hazarika, 2006).

Considerando que as sementes de *V. flavicans* são pequenas (1,5-2 mm), indicando que possuem poucas reservas para propiciar o desenvolvimento da plântula, foi adicionada sacarose ao meio de cultura. Esperava-se que a presença de sacarose favorecesse a sobrevivência e o desenvolvimento do maior número de plantas possível até o 30º dia de cultura, quando seriam transferidas para o meio de multiplicação.

Entretanto, observou-se que a maior porcentagem de germinação e maior número de plantas (92%) foi observado após 30 dias de cultura no meio sem sacarose (0%). Em concentrações de sacarose superiores a 3% a germinabilidade reduziu drasticamente. Para Chou & Youg (1974) concentrações de sacarose por alterar o potencial osmótico do meio podem inibir a germinação de sementes e o crescimento da radícula. Estes resultados não condizem com os de Tichá *et al.*, (1998), que observaram efeito positivo na formação da biomassa nas plântulas de tabaco no meio de cultura adicionado de sacarose.

### **4.3 - Multiplicação**

Nesta fase o objetivo é produzir o maior número possível de brotos vigorosos (Melo *et al.*, 2008), o que é freqüentemente observado com a adição de fitorreguladores, principalmente da classe das citocininas. Em *V. flavicans* ocorre brotações na ausência destes reguladores, provavelmente em resposta aos nutrientes do meio de cultura de acordo com a revisão de Ramage & Williams (2002). Entretanto, na espécie em estudo, o maior número de brotos foi obtido com a concentração de 4,44 µM de BAP combinada com 1,48 µM de AIB, sugerindo que a presença de fitorreguladores no meio de cultura pode maximizar a brotação.

Resultados semelhantes foram obtidos para outras espécies de monocotiledônea, onde a combinação de uma citocinina com uma auxina maximizou a formação de brotos; como em *Curcuma longa* Linn (Nasirujjaman *et al.*, 2005) e na cultivar Pirana precoce de *Allium cepa*

L. (Rodrigues *et al.*, 1996). Já em *Alibertia edulis* Rich, espécie nativa do Cerrado, a combinação BAP e AIB é determinante para a multibrotação (Silva *et al.*, 2008).

A citocinina BAP tem sido utilizada para a indução eficiente de multibrotações em monocotiledôneas como *Dendrobium desiflorum* Lindl. ex Wall (Lou *et al.*, 2008), *Agave parrasana* Berger (Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 1999) e *Zea mays* L. (Hisajima & Arai, 1987). BAP também tem sido utilizada para induzir multibrotações em outras espécies do Cerrado como na mangabeira, *Hancornia speciosa* Gomes (Grigoletto, 1997; Soares *et al.*, 2007), no pequi, *Caryocar brasiliense* Camb. (Santos *et al.*, 2006) e na aroeira, *Myracrodruon urundeuva* Fr. All (Andrade *et al.*, 2000).

Parece não haver influência dos fitorreguladores testados no comprimento dos brotos de *V. flavicans*, pois não se verificam diferenças estatísticas significativas nas diferentes concentrações hormonais, havendo somente a influência do período de cultivo. Este resultado contraria os obtidos no alongamento de outras plantas nativas do Cerrado, como em *Hancornia speciosa* (Soares *et al.*, 2007) e *Myracrodruon urundeuva* (Andrade *et al.*, 2000) onde houve efeito significativo de BAP, e de BAP e ANA em *Caryocar brasiliense* (Santos *et al.*, 2006).

A canela-de-ema é um arbusto com o caule apresentando, no campo, ramificações dicotômicas (Ayensu, 1973). Observações de campo mostram que indivíduos de uma mesma população possuem heterogeneidade na capacidade de emitir brotações. Muitos apresentam apenas dois ramos, sugerindo uma dominância apical extremamente forte.

Durante a fase multiplicação *in vitro*, os genótipos de uma mesma população de *V. flavicans* responderam de forma muito diferente aos tratamentos testados. Dentro desta variabilidade, observou-se tanto plantas altamente responsivas que produziram elevado número médio de brotos, em torno de 12, quanto àquelas que se mostram recalcitrantes ao mesmo tratamento 4,44 µM de BAP, 4,64 µM de CIN e 1,48 µM de AIB (tratamento 9) que produziram apenas 1 broto. Resultados semelhantes foram obtidos por Bucher (2002) ao testar, *in vitro*, a resposta dos genótipos de *Brosimum gaudicaudii*, espécie nativa do cerrado.

A literatura comumente relata a influencia do genótipo nos processos morfogênicos *in vitro*: Bhatia *et al.* (2005) relatam a natureza recalcitrante de alguns genótipos na regeneração de tomate (*Lycopersicon esculentum*); Barandiaran *et al.* (1999) verificam que os genótipos de *Allium sativum* (L.) influenciam tanto na formação de calo quanto na regeneração dos brotos.

De forma geral os genótipos de *V. flavicans* que apresentam as melhores respostas a multiplicação estão expostos as maiores concentrações de BAP, entretanto, estes brotos crescem lentamente. Observa-se que a relação entre comprimento e número médio de brotos é antagônica e pode ser minimizada, após a otimização do balanço entre auxinas e citocininas nos genótipos responsivos, para estabelecer um eficiente controle no crescimento e na diferenciação.

O elevado coeficiente de variação na multiplicação de *V. flavicans* confirmam que a seleção de genótipos responsivos aos fitorreguladores é determinante para viabilizar a produção comercial de mudas. Para Scaltsoyiannes *et al.* (1997) a seleção de genótipos que respondam positivamente para a formação de brotos e para o enraizamento devem ser feitas para a propagação em larga escala de Walnut Trees (*Juglans regia*).

#### **4.4 - Alongamento**

O conceito de cross-talk entre hormônios tem atraído muita atenção com a idéia de que o caminho dos sinais hormonais faz uma complexa teia de interações de informações podendo atuar em sinergismo (Chow & Maccourt, 2004).

Os hormônios envolvidos com o alongamento celular são as auxinas, giberelinas e brassinosteroides (Kende & Zeevaart, 1997; Clouse & Sasse, 1998; Nemhauser *et al.*, 2006). A relação entre auxina e giberelina está bem evidenciada, indicando que a regulação dos níveis de giberelina depende da ação da auxina (Ross *et al.*, 2000).

A adição de diferentes concentrações de AG<sub>3</sub> combinadas com auxinas e citocininas não exerce influência no alongamento dos brotos de *V. flavicans*, embora auxinas e giberelinas sejam hormônios envolvidos com o alongamento celular. O resultado obtido com *V. flavicans* não condiz com o obtido em como em *Betula uber* (Ashe) Fernald (monocotiledônea), onde a combinação de AG<sub>3</sub> com BAP foi significativa no alongamento (Jamison & Renfroe, 1998).

#### 4.5 - Enraizamento e aclimatização

Quando o objetivo é estabelecer um protocolo para a produção de mudas à opção pelo enraizamento *ex vitro* é vantajosa por promover a diminuição dos custos e do trabalho (Hazarika, 2006).

Em *V. flavicans*, nos tratamentos testados, a porcentagem de enraizamento *ex vitro* e a aclimatização foram acima de 40%. Comparado com outras espécies do cerrado, propagadas por tanto por estaquia quanto por micropropagação, estes resultados podem ser considerados de satisfatórios.

Neste contexto, podemos citar os resultados obtidos em estacas, tratadas com 1000 a 4000 ppm de AIB na forma de pó, de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud (unha-de-vaca), *Copaifera langsdorffii* Desf. (copaíba), *Ingá laurina* (S.W.) Willd (ingá), *Calophyllum brasiliense* Camb. (landin), *Simarouba versicolor* St. Hill (perdiz) e *Tibouchina stenocarpa* (DC.) Cogn. (quaresmeira) onde foram observados respectivamente 3%, 10%, 23%, 0%, 0% e 0% de enraizamento (Rios *et al.*, 2001). Como também *in vitro* no meio 1/2MS acrescido de AIB em *Dalbergia miscolobium* Benth. (jacarandá do cerrado), *Dimorphandra mollis* Benth. (faveiro), *Pterodon pubescens* Benth. (sucupira branca) e *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão) onde foram observados respectivamente 25%, 2%, 0% e 37% (Reis 2001).

A análise anatômica mostra que as raízes adventícias de *V. flavicans* se diferenciam na região do periciclo/endoderme e nos feixes vasculares, indicando que a vascularização da raiz está conectada com a do caule, como também foi observado por Moreira *et al.* (2000) em *Gomphrena macrocephala* St. Hil., uma erva nativa do Cerrado.

Plantas de *V. flavicans* colocadas para aclimatização dentro da câmara de crescimento em copos cobertos com sacos plásticos, após a retirada dos sacos apresentam uma taxa de mortalidade próxima a 98%. A mortalidade, provavelmente, deve-se as modificações anatômicas associada às condições de umidade dentro da câmara de crescimento (capítulo II). Grigoletto (1997) relata que a transferência direta de plantas de *Hancornia speciosa* cultivadas *in vitro* para os substratos causaram uma mortalidade próxima a 94%.

Em *V. flavicans* 100% das plantas aclimatizadas que foram transferidas para o viveiro (aclimatização) sobreviveram, tais resultados pode ser explicado pelas folhas novas formadas sob a condição da casa de vegetação provavelmente, possuem as modificações anatômicas necessárias para a sobrevivência da planta (capítulo II).

## 5 - CONCLUSÕES

- ? A germinação e o desenvolvimento das plantas de *V. flavicans* para a produção de explantes pode ser feita na câmara de crescimento com temperatura de  $27 \pm 2$  °C sem a adição de sacarose.
- ? A adição de 44,44 µM de BAP combinada com 1,48 µM de AIB no meio de cultura forma o maior número de brotos.
- ? As seleções de genótipos que respondam para a formação de brotos devem ser feitas para a propagação em larga escala de *V. flavicans* e, apresentam as melhores respostas quando expostos a concentrações de 4,44 µM de BAP combinados com 4,64 µM de CIN e 1,48 µM de AIB.
- ? A adição das diferentes concentrações de AG<sub>3</sub> combinadas com auxinas e citocininas não exerce influência no alongamento dos brotos de *V. flavicans*.
- ? Em casa de vegetação, a porcentagem de enraizamento *ex vitro* (56%) e de aclimatização (100%) foram elevadas, quando comparadas com outras espécies nativas do Cerrado.
- ? Plantas aclimatizadas foram transferidas para o viveiro e apresentaram 100% de sobrevivência.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. xiii+464p.
- ANDRADE, M. W. de.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia** **24**, n.1, p.174-180, jan./mar., 2000.
- AYENSU, E. S. Biological and morphological aspects of the velloziaceae. **Biotropica** **5**(3): 135-149, 1973.
- Barandiaran, X.; Martin, N.; Rodriguez-Conde, M. F.; Di Pietro, A.; Martin, J. Genetic variability in callus formation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Reports** vol. **18**, n. 5, 434-437, 1999.
- BEWLEY, J. D. Seed Germination and Dormancy. **The Plant Cell** **9**, 1055-1066, 1997.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Seeds: Physiology of Development and Germination. **New York: Plenum Press**, 1994.
- BHATIA, P.; ASHWATH, N.; MIDMORE D. J. Effects of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** **41**: 457-464, 2005.
- BUCHER, J. P. Aspectos de conservação *in vitro* e micropropagação de *Brosimum gaudichaudii*. 2002, Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Brasília.
- CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. Aclimação de plantas: abordagens recentes. **ABCTP Notícias** **25**, 2-12, 1996.
- CHOU, C. H.; YOUNG, C. C. Effects of osmotic concentration and pH on plant growth. **Taiwania** **19**, n.2, 1974.
- CHOW, B.; MACCOUNT, P. Crosstalk in plant signal transduction special issue. **Journal of Experimental Botany** **55**, n.395, 247-251, 2004.
- CLOUSE, S.D., SASSE, J. M. Brassinosteroides: Essential regulators of plant growth and development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **49**: 427-451, 1998.
- GARCIA, Q.; DINIZ, I. Comportamento Germinativo de Três Espécies de Vellozia da Serra do Cipó, MG, **Acta Botânica Brasílica** v. **17**, n. 4, p. 487-494, 2003.

- GRIGOLETTO, E. R. Micropropagação de *Hancornia speciosa* Gomes (Mangabeira). 1997, Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Brasília.
- HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Scientia Horticulture** **108**, 105-120, 2006.
- HISAJIMA, S.; ARAI, Y. Micropropagation of Maize Plant through Seed Culture *in vitro*. **Plant Tissue Culture Letters** **4**(1), 38-40, 1987.
- JAMISON, J. A.; RENFROE, M. H. Micropropagation of *Betula uber* (Ashe) Fernald. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** **34**: 147-151, 1998.
- KENDE, H.; ZEEVAART, J. A. D. The five Classical plant hormones. **The plant cell** vol. **9**, 1197-1210, 1997.
- LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington, 1983.
- LUO, J. P.; WANG, Y.; ZHA, X. Q.; HUANG, L. Micropagation of *Dendrobium densiflorum* Lindl. Ex Wall. Trroug protocorm-like bodies: effects of plant growth regulator and lanthanoids. **Plant Cell Tiss Organ Culture** **93**: 333-340, 2008.
- MELO, J. T.; SILVA, J. A.; TORRES, R. A. A. A.; SILVEIRA, C. E. S.; CALDAS, L. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies de cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Eds.). **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: EMBRAPA-CPAC, 2008. 406 p.
- MENEZES, N. L. **Estudos anatômicos e a taxonomia da família Velloziaceae**. 1970. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MENEZES, N. L., **Características anatômicas e a filogenia, na família Velloziaceae**. 1984. Tese de Livre-Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MERCIER, H.; GUERREIRO FILHO, O. Germinação de *Pleurostima fanniei* Menezes, *Pleurostima Rogieri* (Hort. Ex. Moore & Ayres) Menezes e *Vellozia alata* L. B. Smith (Velloziaceae) sob diferentes condições de luz e temperatura. **Hoehnea** **16**: 195-202, 1989.
- MOREIRA, F. M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; ZAI-DAN, L. B. P. Anatomical aspects of IBA-treated micro-cuttings of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. **Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba** **43** (2): 221-227, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantatum** **15**, p.473-497, 1962.

- NEMHAUSER, J. L.; HONG, F.; CHORY, J. Different Plant Hormones Regulate Similar Processes through Largely Nonoverlapping Transcriptional Responses. **Cell** **126**, 467-475, 2006.
- NASIRUJJAMAN, K.; UDDIN, M. S.; ZAMAN, S.; REZA, M. A. Micropropagation of Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) through *in vitro* Rhizome Bud Culture. **Journal of Biological Sciences** **5** (4): 490-492, 2005.
- OLIVEIRA, R. C. de, BORGHETTI, F. Estudo Comparativo quanto à Germinação de Quatro Populações de *Vellozia Squamata* Encontradas no Distrito Federal. **54º Congresso Nacional de Botânica**, Belém. 2003.
- PAIVA, J. G. A.; FRANK-DE-CARVALHO, S. M.; MAGALHÃES, M.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botânica Brasílica** **20**, 257-264, 2006.
- RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. Mineral nutrition and plant morphogenesis **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** **38** : 116-124, 2002.
- REIS, G. M. C. L. Enraizamento *in vitro* de quatro leguminosas lenhosas de Cerrado. 2001, Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Brasília.
- RIBEIRO, J. F.; FONSECA, C. E. L.; MELO, J. T.; ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A., Propagação de fruteiras nativas do cerrado. In: PINTO, A. C., **Produção de mudas sob condições do ecossistema de cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, Documentos, 62, p. 55-80. 1996.
- RIOS, M. N. S.; RIBEIRO, J. F.; REZENDE, M. E. Propagação vegetativa: enraizamento em estacas de espécies nativas de Mata de Galeria. In: RIBEIRO, J. F., FONSECA, C. E. L., SOUZA-SILVA, J. C., **Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001.899p.
- RODRIGUES, B. M.; PINTO, J. E. B. P.; MALUF, W. R.; SOUZA, C. M. Micropropagação de cebola a partir de bulbinhos induzidos *in vitro*. **Bragantia** **55** (1) 19-28, 1996.
- ROSS, J.J.; NEILL, D. P.; SMITH, J. J.; KERCKHOFFS, L. H. J.; ELLIOTT, R. C. Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. **The Plant Journal** **21**(6), 547-552, 2000.

- SANTACRUZ-RUVALCABA, F.; GUTIERREZ-PULIDO, H.; RODRIGUEZ-GARAY, B. Efficient in vitro propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **56**: 163–167, 1999.
- SANTOS B. R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M.; MARTINOTTO, C.; SOARES F. P.; SILVA, D. P. C.; PAIVA, P. D. O. Micropropagação do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura* v. **28**, n. 2, p. 293-296, Jaboticabal-SP, 2006.
- SCALTSOYIANNES, A.; TSOULPHA, P.; PANETSOS, K. P.; MOULALIS, D. Effect of Genotype on Micropropagation of Walnut Trees (*Juglans regia*). *Silvae Genetica* **46** : 6, 1997.
- SILVA, J. C. S. Aspectos da Germinação de *Vellozia flavicans*, in: **Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo 5**, Botucatu, SP, 1985, p.136.
- SILVA, J. C. S. Fenologia de espécies do estrato herbáceo-arbustivo dos cerrados, in: **Relatório Técnico anual do Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados**, Planaltina, DF, EMBRAPA-CPAC. 1991.
- SILVA, J. C. S.; ALMEIDA S. P.; RIBEIRO, J. F. Fenologia de *Vellozia flavicans* Martius ex-Schultes f., in: **Relatório Técnico anual do Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados**, Planaltina, DF, EMBRAPA-CPAC. 1987.
- SILVA, F. A. B. S., PEREIRA, L. A. R., SILVEIRA, C. E. S., Micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **55** (6) 1103-1114, 2008.
- SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese Direta em explantes caulinares de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) *Ciência e Agrotecnologia* **31** (4) 1048-1053, 2007.
- SOUZA, V. C. **Botânica Sistemática**: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, Baseado em APG II, Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum. 2005.
- TICHÁ, I.; CAP, F.; PACOVSKÁ, D.; HOFMAN, P.; HAISEL, D.; CAPKOVÁ, V.; SCHÄFER, C. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown in vitro. *Physiologia Plantarum* **102**, 155-162, 1998.
- TOMBOLATO, A. F. C.; VEIGA, R. F. A.; BARBOSA, W.; COSTA, A. A.; JUNIOR R. B.; PIRES, E. G. **O Agrônomo** **56** (1), 2004.

## 7 – ANEXOS

### 7.1 – Tabelas de análise de variância

**Tabela 12-** Análise de variância do número de sementes armazenadas germinadas em diferentes temperaturas e concentração de sacarose em *V. flavicans*

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TEMPERATUR	4	236.200000	59.050000	32.462	0.0000
SACAROSE	1	3.214286	3.214286	1.767	0.1888
TEMPERATUR*SACAROSE	4	10.714286	2.678571	1.473	0.2218
erro	60	109.142857	1.819048		
Total corrigido	69	359.271429			
CV (%) =	52.74				
Média geral:	2.5571429	Número de observações:	70		

**Tabela 13-** Análise de variância do número de sementes recém coletadas germinadas em diferentes concentrações de sacarose em *V. flavicans*

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONCENTRAÇÃO	6	708.257854	118.042976	99.819	0.0000
erro	51	60.311111	1.182571		
Total corrigido	57	768.568966			
CV (%) =	18.39				
Média geral:	5.9137931	Número de observações:	100		

**Tabela 14-** Análise de variância do número de brotos formados em *V. flavicans*. Opção de transformação:Raiz quadrada de  $Y + 1.0 - \text{SQRT}(Y + 1.0)$ 

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BA	2	2.209664	1.104832	4.748	0.0092
CIN	2	2.887471	1.443736	6.204	0.0022
SUB	2	35.895383	17.947692	77.123	0.0000
BA*CIN	4	1.444162	0.361040	1.551	0.1868
BA*SUB	4	0.047864	0.011966	0.051	0.9950
CIN*SUB	4	1.673033	0.418258	1.797	0.1288
BA*CIN*SUB	8	1.346729	0.168341	0.723	0.6709
erro	357	83.079296	0.232715		
Total corrigido	383	128.583601			
CV (%) =	25.82				
Média geral:	1.8683329	Número de observações:	384		

**Tabela 15-** Análise de variância do comprimento dos brotos formados em *V. flavicans* Opção de transformação: Raiz quadrada de  $Y + 1.0 - \text{SQRT}(Y + 1.0)$ 

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BA	2	1.382038	0.691019	14.585	0.0000
CIN	2	0.060386	0.030193	0.637	0.5293
SUB	2	0.991921	0.495960	10.468	0.0000
BA*CIN	4	0.141230	0.035308	0.745	0.5617
BA*SUB	4	0.129821	0.032455	0.685	0.6027
CIN*SUB	4	0.265691	0.066423	1.402	0.2328
BA*CIN*SUB	8	0.241601	0.030200	0.637	0.7462
erro	357	16.913724	0.047377		
Total corrigido	383	20.126413			
CV (%) =	12.68				
Média geral:	1.7170815	Número de observações:	384		

**Tabela 16-** Análise de variância do alongamento dos brotos em *V. flavicans*

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GA	3	0.751351	0.250450	0.489	0.6902
CULTURA	2	129.333333	64.666667	126.225	0.0000
GA*SUBCULT	6	4.514286	0.752381	1.469	0.1903
erro	210	107.585714	0.512313		
Total corrigido	221	242.184685			
CV (%) =	32.23				
Média geral:	2.2207207	Número de observações:	222		

**Tabela 17-** Análise de variância do número de folhas nos brotos em *V. flavicans*

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GA	3	22.342085	7.447362	1.241	0.2958
SUBCULT	2	1778.171171	889.085586	148.162	0.0000
GA*SUBCULT	6	35.676448	5.946075	0.991	0.4324
erro	210	1260.157143	6.000748		
Total corrigido	221	3096.346847			
CV (%) =	21.17				
Média geral:	11.5720721	Número de observações:	222		

## Capítulo II

### **Anatomia foliar de plantas de canela-de-ema (*Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f.) em diferentes condições ambientais.**

(Trabalho a ser submetido para publicação na revista Acta Botânica Brasílica)

**Anatomia foliar de plantas de canela-de-ema (*Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f.) em diferentes condições ambientais.**

Olegário Garcia de Freitas Neto<sup>1</sup>, Sueli Maria Gomes<sup>2</sup>, Luiz Alfredo Rodrigues Pereira<sup>2</sup>

Conceição Eneida dos Santos Silveira<sup>2</sup>

**RESUMO** – (Anatomia foliar de plantas de canela-de-ema (*Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f.) em diferentes condições ambientais). A canela-de-ema é um arbusto nativo do Cerrado brasileiro que apresenta grande potencial ornamental. Dificuldades encontradas no cultivo convencional destas plantas e o seu crescimento lento justificam a utilização das técnicas da cultura de tecidos. O objetivo do presente trabalho é comparar a anatomia das folhas de canelas-de-ema cultivadas *in vitro*, em casa de vegetação e em condições naturais. As folhas das plantas em cada condição ambiental foram fixadas, seccionadas e analisadas. As plantas aclimatizadas apresentaram anatomia semelhante às plantas em condições naturais, ambas apresentam criptas estomatíferas na face abaxial, feixe de fibras subepidérmicas adaxiais e parênquima aquífero. Estas características não foram observadas nas plantas cultivadas *in vitro*. A cutícula mostrou-se espessa nas plantas em regime de campo, muito delgada nas cultivadas *in vitro* e intermediária nas aclimatizadas. Dentre as variações nos caracteres anatômicos foliares de canelas-de-ema, destaca-se a ausência de criptas estomatíferas nas plantas cultivadas *in vitro*, estas estruturas são pronunciadas alcançando cerca de um terço da espessura do mesófilo foliar em plantas em condições naturais. As diferenças estruturais nas folhas das plantas estudadas podem estar associadas às condições ambientais.

**Palavras-chave:** *Vellozia flavicans*, micropropagação, anatomia foliar, aclimatização

**ABSTRACT** – (Leaf anatomy of canela-de-ema (*Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f.) plants grown in different environmental conditions). Canela-de-ema is a shrub of Brazilian Cerrado that has a great ornamental potential. This plant is difficult to propagate by the conventional agricultural techniques, which made possible to use plant tissue culture techniques to propagate this species. The goal of this study is to compare the leaves of canela-de-ema plants taken from *in vitro* plants non-acclimatized, *in vitro* acclimatized plants in greenhouse, and natural environment. Leaf samples were from each type of plant fixed, embedded, sectioned and analyzed. Greenhouse acclimatized and natural grown plants presented similar anatomical features. Both types presented stomatal crypts on the abaxial side of the leaf, sub-epidermal fiber bundles on the adaxial side and aquiferous parenchyma. These characteristics were not seen in non-acclimatized *in vitro* plants. The cuticle was thicker in the plants grown in natural conditions. Among the anatomical characteristics observed, the presence of stomatal crypts appears to be one of the most important for the survival of the plants, as the crypts may reach about one third of the leaf thickness. The leaf structural differences observed among the plants studied may directly be associated with the environmental conditions.

**Key words:** *Vellozia flavicans*, micropropagation, anatomy the leaves, acclimatization

<sup>1</sup>Mestrando em Botânica – Universidade de Brasília, <sup>2</sup> Docentes do Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade de Brasília, C.P. 4.457, Brasília, DF, CEP 70919-970  
Autores para correspondência: [smgomes@unb.br](mailto:smgomes@unb.br), [cess@unb.br](mailto:cess@unb.br)

## Introdução

Velloziaceae apresenta aproximadamente 250 espécies tropicais, circunscritas em seis gêneros (Ayensu 1973; Smith & Ayensu 1974;1976), divididos por Menezes (1971a; 1980) em *Aylthonia*, *Burlemaxia*, *Barbacenia*, *Pleurostima*, *Vellozia* e *Xerophyta*.

A família apresenta muitas espécies com valor ornamental, tanto por sua arquitetura peculiar, quanto pela beleza de suas folhagens e flores (Menezes 1970; 1984; Mercier & Guerreiro Filho 1989; Silva 1991; Almeida *et al.* 1998). O pouco uso destas plantas como ornamentais pode ser atribuído à dificuldade de cultivo e crescimento lento (Souza 2005). Considerando-se estes aspectos, um protocolo de propagação *in vitro* foi desenvolvido para estas plantas (Capítulo I).

A anatomia dos órgãos vegetativos e reprodutivos de espécies de Velloziaceae foi abordada em vários trabalhos (Ayensu 1968, 1974; Ayensu & Skavarla 1974; Menezes 1970, 1971b, 1976, 1977, 1984, 1988; Menezes & Semir 1991), inclusive sobre *V. flavicans* Mart. *ex* Schult. f. (Ayensu 1974; Menezes 1977), mas não foram encontrados estudos relacionados a plantas cultivadas *in vitro* pertencentes a esta família.

O objetivo do presente trabalho é caracterizar anatomicamente a estrutura foliar de *Vellozia flavicans* em plantas cultivadas *in vitro*, em casa de vegetação e em condições naturais (campo), visando identificar possíveis diferenças anatômicas face às três condições de cultivo e sua influência no processo de aclimatização.

## Material e Métodos

Ramos férteis das plantas da população matriz foram herborizados e depositados no Herbário da Universidade de Brasília sob os números UB77645 e UB77646. Ápices vegetativos de plantas adultas e folhas muito jovens, com aproximadamente 0,2 cm de comprimento, em condições naturais foram coletadas para o estudo anatômico.

As plantas micropropagadas (capítulo I) foram retiradas para o estudo anatômico do material *in vitro*, regeneradas em meio de cultura composto por macro e micronutrientes de Murashige & Skoog (1962), acrescido de 2% de sacarose e 100 mg.L<sup>-1</sup> de myo-inositol e 8 g.L<sup>-1</sup> de ágar. O pH dos meios foi ajustado para 5,7-5,8 antes da autoclavagem e da adição de ágar. A esterilização dos meios foi feita em autoclave a 121 °C com pressão de 104 KPa por

20 minutos e mantidos em câmara de crescimento com  $27\pm 2$  °C, umidade aproximada de 80% e iluminação com lâmpadas luz do dia, com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de  $32 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Foram usadas para o estudo anatômico folhas completamente distendidas com cerca de 5,0 cm de comprimento.

As plantas aclimatizadas para o estudo anatômico foram retiradas da casa de vegetação, oriundas da fase de multiplicação (Capítulo I) que foram plantadas em copos plásticos de 500 mL perfurados, contendo vermiculita e latossolo vermelho (1:3) autoclavada e umedecida com água destilada estéril, com suas bases tratadas com uma mistura de AIB a 1000ppm. O controle foi feito sem o AIB. Foram usadas para o estudo anatômico folhas completamente distendidas com cerca de 8,0 cm de comprimento.

Retirou-se a região mediana das terceiras e quartas folhas, a contar do ápice para a base, de plantas com 40 dias de cultura *in vitro*, com 180 dias em casa de vegetação e adultas coletadas no campo; amostras de pelo menos dois indivíduos submetidos a cada condição ambiental foram analisadas. Os segmentos das folhas foram fixados em FAA (formalina, ácido acético, álcool etílico), desidratados em gradiente crescente etanólico e incluídos em parafina (Johansen 1940). Secções transversais seriadas com 12-15  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo Leica modelo RM 2145. Os cortes foram distendidos em placa histológica a 45 °C, sendo aderidos às lâminas utilizando o adesivo de Haupt (Kraus & Arduim 1977). As lâminas foram coradas com Safranina e Azul de Toluidina e montadas com verniz vitral incolor (Paiva *et al.* 2006).

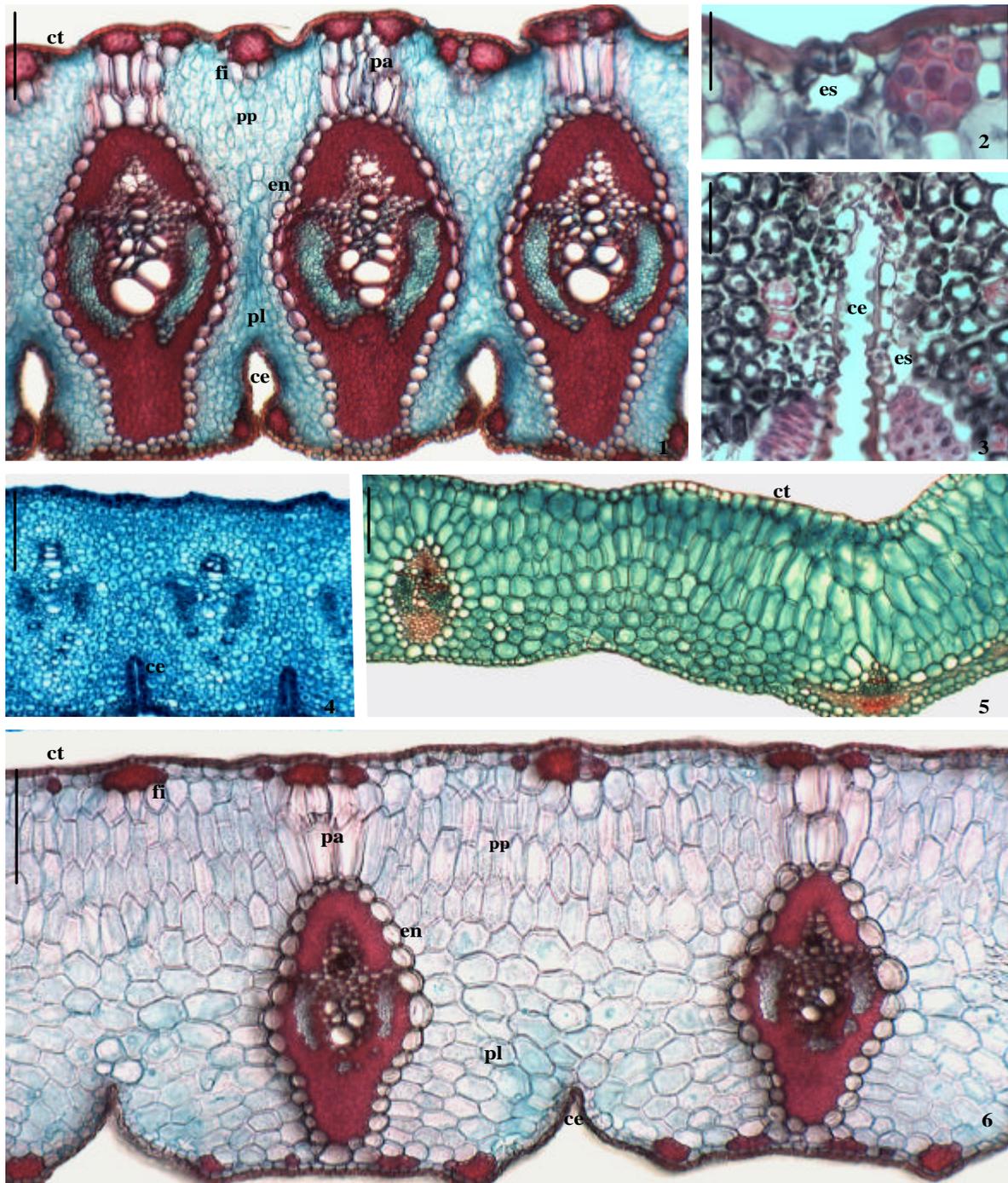
Segmentos de folhas fixadas oriundos das três condições ambientais foram seccionados com o auxílio de micrótomo de bancada e lâmina de barbear. Os cortes foram clarificados em solução de hipoclorito de sódio 0,25% durante 15 min e hipoclorito de sódio 1,25% por 10 min, sendo lavados em água destilada, desidratados em gradiente etanólico, corados com Azul de Alcian e Safranina (4:1) e montados em lâmina com verniz vitral incolor (Paiva *et al.* 2006). Estes cortes foram comparados com aqueles obtidos mediante inclusão em parafina e os melhores resultados foram registrados em fotomicroscópio Zeiss modelo Axioskop acoplado ao sistema digital de captura de imagens com o Software ImagePro 4.0.

## Resultados

Em *Vellozia flavicans*, a região mediana das folhas apresenta a epiderme uniestratificada nas duas faces foliares. Folhas adultas e jovens das plantas coletadas no campo apresentam as criptas estomatíferas com aproximadamente um terço da espessura da lâmina foliar e estão presentes na face abaxial (Fig. 1, 4), enquanto as plantas micropropagadas não possuem criptas estomatíferas (Fig. 5) e as plantas aclimatizadas em casa de vegetação têm as criptas com aproximadamente um quarto da espessura da lâmina (Fig. 6). A cutícula da folha adulta em regime de campo é espessa nas duas faces, com superfície lisa na face adaxial (Fig. 2) e ornamentada na abaxial (Fig. 3) não sendo observada na folha jovem de campo (Fig. 4), na planta cultivada *in vitro* é muito delgada (Fig. 5) e com espessura intermediária na folha aclimatizada (Fig. 6).

O mesofilo é dorsiventral nas folhas adultas de plantas em condições naturais e aclimatizadas, com uma diferenciação menos acentuada do parênquima paliçádico nestas últimas (Fig. 1 e 7), enquanto que o mesofilo tende a homogêneo, com um parênquima paliçádico ausente ou pouco diferenciado nas plantas cultivadas *in vitro* (Fig. 5) e nas folhas jovens de campo (Fig. 4). Os feixes de fibras nas regiões subepidérmicas adaxial e abaxial são mais abundantes nas plantas adultas em condições naturais (Fig. 1, 2 e 3) do que nas aclimatizadas (Fig. 7) e estão ausentes nas cultivadas *in vitro* (Fig. 5) e nas jovens em condições naturais (Fig. 4).

Nas folhas examinadas, feixes vasculares de diâmetros semelhantes intercalam-se paralelos entre si no mesofilo e mais próximos da face abaxial do que da adaxial (Fig. 1, 5 e 7), sendo que o feixe da dobra foliar é de menor calibre (Fig. 5). Dois cordões floemáticos ladeiam o cordão xilemático central, sendo que a bainha parenquimática (endoderme) é conspícua em todas as folhas analisadas (Fig. 1-6). As extensões adaxiais da bainha constituem um parênquima aquífero nas plantas adultas de campo e aclimatizadas (Fig. 1 e 6), estando ausentes naquelas cultivadas *in vitro* (Fig. 5) e jovens de campo (Fig. 4). As fibras pericíclicas associadas aos feixes vasculares são mais abundantes e com paredes mais espessas nas folhas de plantas adultas em condições naturais (Fig. 1) do que nas aclimatizadas (Fig. 6), sendo pouco diferenciadas nas cultivadas *in vitro* (Fig. 5) e jovens de campo (Fig. 4).



**Figura 1.** Cortes histológicos (secções transversais) da folha de *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. 1) planta em regime de campo mostrando cutícula, epiderme, mesofilo com fibras abundantes, parênquima paliçádico e esponjoso, bainha do feixe e feixe vasculares (barra = 200µm). 2) estômato (astersico) e cutícula da face adaxial sem ornamentação (barra = 50 µm). 3) cripta stomatífera na face abaxial com estômato (asterisco) e cutícula ornamentada (barra = 50µm). 4) folha jovem em regime de campo com sulcos na face abaxial (barra = 50 µm). 5) planta micropropagada mostrando o mesofilo pouco diferenciado, ausência de criptas, parênquima aquífero e fibras subepidêrmicas (barra=100µm). 6) planta aclimatizada mostrando cutícula, fibras subepidêrmicas, parênquima aquífero, e mesofilo bem diferenciado (barra=100 µm).ct=cutícula. fi=fibras. pa=parênquima aquífero. pp=parênquima paliçádico. pl=parênquima lacunoso. en=endoderme. ce=cripta estomatífera. es=estômato.

## Discussão

As características anatômicas das folhas adultas de *Vellozia flavicans* em regime de campo são similares às observadas em outras espécies do gênero, tais como presença de fibras subepidérmicas, parênquima aquífero e paliádico e criptas estomatíferas (Menezes 1977, 1984; Ayenso 1974; Mello-Silva 1997), que estão entre os caracteres xeromorfos típicos de plantas do Cerrado, como os apontados por Morretes & Ferri (1959). A folha jovem de *V. flavicans* apresenta características semelhantes ao primórdio foliar de *V. candida* com mesofilo indiferenciado, ausência de parênquima aquífero e fibras e presença de criptas estomatíferas (Menezes 1984). Estas últimas estruturas diferenciam-se muito precocemente no desenvolvimento foliar destas duas espécies.

No ambiente *in vitro*, as folhas desta planta sofreram modificações drásticas, como a perda das criptas, do parênquima aquífero, das fibras e alterações no mesofilo, apresentando características de plantas mesomórficas. Isto sugere que as características morfo-anatômicas da planta *ex vitro* (aclimatizadas e adultas de campo) constituem respostas a condições ambientais adversas, apresentando-se como uma vantagem adaptativa desta espécie ao estresse hídrico.

Modificações morfológicas, anatômicas e fisiológicas são descritas para plantas de diferentes espécies cultivadas *in vitro* (Wetzstein & Sommer 1982; Apostolo *et al.* 2005; Barbosa *et al.* 2006; Mayer *et al.* 2008). Baixa luminosidade, alta umidade relativa e desenvolvimento heterotrófico caracterizam o ambiente *in vitro* (Campostrini & Otoni 1996; Hazarika 2006), tornando-o diferente das condições de campo. O conhecimento das mudanças dos caracteres das plantas que crescem *in vitro* são importantes para o desenvolvimento de protocolos eficientes para a fase de aclimatização (Pospíšilová 1999; Hazarika 2003; 2006).

A diminuição da espessura da cutícula encontrada em *V. flavicans* cultivada *in vitro*, em relação às plantas *ex vitro* também foi constatada em *Cymbidium Hort.*, Orchidaceae (Mayer *et al.* 2008), *Liquidambar styraciflua* L., Hamamelidaceae (Wetzstein & Sommer 1982), e *Cynara scolymus* L., Asteraceae (Apostolo *et al.* 2005).

Na literatura consultada não foi encontrada nenhuma alteração tão drástica durante o cultivo *in vitro* quanto a perda das criptas estomatíferas aqui relatada para *V. flavicans* que começa a se diferenciar muito cedo (folha jovem de campo). Esta estrutura não é encontrada em todos os gêneros de Velloziaceae e geralmente está presente em *Vellozia* e ausente em *Xerophyta* (Menezes 1984).

Para Esau (1974), fatores ambientais podem induzir xeromorfia em folhas normalmente mesófitas, ou intensificar caracteres xeromorfos de plantas xerófitas, destacando-se a baixa umidade ou disponibilidade de água. O cultivo *in vitro* proporciona um microambiente com alta umidade relativa do ar e baixa intensidade luminosa. Tais condições ambientais revelaram características mesomórficas nas folhas de *V. flavicans*, que *ex vitro* se mostram xeromorfas. Isto pode sugerir uma possível origem mesofítica para esta espécie, e não uma origem xerofítica para toda a família, conforme hipótese de Menezes (1984).

As alterações no parênquima paliçádico constatadas em *V. flavicans* também ocorrem em *Liquidambar styraciflua* (Wetzstein & Sommer 1982), onde o mesofilo é dorsiventral nas plantas que vegetam *ex vitro*, sendo homogêneo ou com parênquima paliçádico pouco diferenciado naquelas cultivadas *in vitro*. Iluminação intensa e redução no fluxo da água devido a stress hídrico podem causar um aumento do parênquima paliçádico (Fanh 1990); no sentido oposto, as condições de cultivo *in vitro* (baixa intensidade luminosa e ausência de stress hídrico) promovem a perda da diferenciação do mesofilo, conforme constatado nas duas espécies acima. Isto reforça a hipótese da origem mesofítica para *V. flavicans*.

Plantas de *V. flavicans* durante o cultivo *in vitro* não apresentam fibras subepidérmicas, que são estruturas que reduzem os efeitos danosos do murchamento em xerófitas (Scatena 2006; Menezes *et al.* 2006; Esau 1974), que voltam a ser visualizadas *ex vitro*. Menezes (1984) verificou que as fibras que acompanham os feixes vasculares e as subepidérmicas em algumas espécies de Velloziaceae aparecem tanto em plantas cultivadas em casa de vegetação a partir de sementes como em plantas no ambiente natural. O resultados obtido no cultivo *in vitro* de *V. flavicans* contradiz a sua afirmação de que mesmo sob condições ambientais modificadas as fibras estariam presentes na família.

Pode-se considerar que o parênquima aquífero de *V. flavicans* está associado a fatores ambientais, já que está presente *ex vitro* nas folhas adultas e desaparece ou apresenta-se pouco diferenciado nas plantas *in vitro*, diferindo do que ocorre em folhas de abacaxi (*Ananas comosus* L., Bromeliaceae), que apresentam hipoderme e parênquima aquífero também sob condição *in vitro* (Barbosa *et al.* 2006). Para Ayensu (1973), o desenvolvimento do parênquima aquífero de Velloziaceae ocorreu quando as espécies africanas se espalharam na América do Sul e encontraram mudanças microclimáticas que exerceram pressões seletivas.

*V. flavicans* apresenta dificuldade no processo de aclimatização, face às severas modificações anatômicas sofridas *in vitro* que resultam em perda excessiva de água. Conforme

observado para outras espécies de plantas (Sutter & Langhans 1982; Wetzstein & Sommer 1982; Pospíšilová 1999; Zobayed 2001).

Plantas de *V. flavicans* colocadas para aclimatização dentro da câmara de crescimento apresentam uma taxa de mortalidade próxima a 98% e, a maior porcentagem de plantas aclimatizadas (56%) foi obtida em casa de vegetação, com temperatura do ambiente 40 °C, umidade relativa 95%, intensidade luminosa 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Indicando ser necessário para sua aclimatização condições ambientais próximas a encontrada *in vitro*.

Embora seja usual a utilização de sulcos em alguns trabalhos sobre Velloziaceae para designar a cripta estomatífera (Ayensu 1968; 1974; Menezes 1977; 1984; Mello-Silva 1997), optou-se pela utilização deste último termo, adotado na descrição da anatomia de plantas do Cerrado (Morretes & Ferri 1959) e conforme o conceito de que se trata de uma “depressão na folha, sendo os estômatos abrigados pela epiderme” (Appezzato-da-Gloria & Carmello-Guerreiro 2006).

## Referências Bibliográficas

- Almeida, S.P.; Proença, C.E.B.; Sano, S.M. & Ribeiro, J.F. 1998. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina, EMBRAPA-CPAC.
- Appezzato-da-Gloria, B. & Carmello-Guerreiro, S.M. 2006. **Anatomia Vegetal**. Viçosa, Ed. UFV.
- Apostolo, N.M.; Brutti, C.B. & Llorente, B.E. 2005. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* **41**: 307-313.
- Ayensu, E.S. 1968. The anatomy of *Barbaceniopsis* a new genus recently described in the Velloziaceae. *American Journal of Botany* **55**(4): 399-405.
- Ayensu, E.S. 1973. Biological and morphological aspects of the Velloziaceae. *Biotropica*, **5**(3): 135-149.
- Ayensu, E.S. 1974. Leaf anatomy and systematics of new world Velloziaceae. *Smithsonian Contributions to Botany* **15**: i-vi+1-125.
- Ayensu, E.S. & Skvarla, J.J. 1974. Fine Structure of velloziaceae pollen. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **101**(5): 250-206.

- Barbosa, S.B.S.C.; Graciano-Ribeiro, D.; Teixeira, J.B.; Portes, T.A. & Souza, L.A.C. 2006. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa agropecuária brasileira** **41**(2):185-194.
- Campostrini, E. & Otoni, W.C. 1996. Aclimação de plantas: abordagens recentes. **ABCTP Notícias** **25**: 2-12.
- Esau, K. 1974. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo, Edgard Blucher.
- Fahn, A.1990. **Plant anatomy**.Oxford, Pergamon Press.
- Hazarika, B.N. 2003. Acclimatization of tissue cultured plants. **Current Science** **85**: 1705-1712.
- Hazarika, B.N. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulture** **108**: 105-120.
- Johansen, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. New York, MacGraw-Hill Book Co.
- Kraus, J.E. & Arduin, M. 1997. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro, EDUR.
- Mayer, J.L.S.; Ribas, L.L.F.; Bona, C. & Quoirin, M. 2008. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Botanica Brasilica**. **22** (2): 323-332.
- Mello-Silva, R. 1997. *Vellozia sessilis* L. B. SM. Ex Mello-Silva (Velloziaceae) **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** **16**: 65-69.
- Menezes, N.L. 1970. **Estudos anatômicos e a taxonomia da família Velloziaceae**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Menezes, N.L. 1971a. New taxa and new combinations in Velloziaceae. **Ciência and Cultura** **23**: 421-422.
- Menezes, N.L. 1971b. Traqueídes de transfusão no gênero *Vellozia* Vand. **Ciência & Cultura** **23**: 389-409.
- Menezes, N.L. 1976. Megaesporogênese, Megagametogênese e Embriogênese em Velloziaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** **4**: 41-60.
- Menezes, N.L. 1977. Aspectos morfológicos e anatômicos do desenvolvimento de plântulas de Velloziaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** **5**: 65-77.
- Menezes, N.L. 1980. Evolution in Velloziaceae with special reference to androecial characteres. **Linn. Soc. Ser. & Academic Press**, London.

- Menezes, N.L. 1984. **Características anatômicas e a filogenia, na família Velloziaceae.** Tese de Livre-Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Menezes, N.L. & Semir, J. 1991. Bурlemaxia a new genus of Velloziaceae. **Taxon** **40**: 413-426.
- Menezes, N.L.; Silva, D.C. & Pinna, G.F.A.M. 2006. Folha. In: Appezzato-Da-Gloria, B., Carmello-Guerreiro, S. M., **Anatomia Vegetal.** Viçosa, Ed. UFV.
- Mercier, H. & Guerreiro Filho, O. 1989. Germinação de *Pleurostima fanniei* Menezes, *Pleurostima Rogieri* (Hort. Ex. Moore & Ayres) Menezes e *Vellozia alata* L. B. Smith (Velloziaceae) sob diferentes condições de luz e temperatura. **Hoehnea** **16**: 195-202.
- Morretes, B.L. & Ferri, M.G. 1959. Contribuição ao estudo da anatomia das folhas de plantas dos cerrados. I. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP (Botânica)** **243**(16): 7- 70.
- Murashige, T. & Skoog, F.A. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** **15**: 473-497.
- Paiva, J.G.A.; Frank-De-Carvalho, S.M.; Magalhães, M. & Graciano-Ribeiro, D. 2006. Verniz vitral incolor 500<sup>®</sup>: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botânica Brasílica** **20**: 257-264.
- Pospíšilová, J.; Tichá, I.; Kadlecěk, P.; Haisel, D. & Plzáková, Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, **42** (4): 481-497.
- Scatena, V. L. & Scremin-Dias, E. 2006. Parênquima, colênquima e esclerênquima. In: Appezzato-Da-Gloria, B., Carmello-Guerreiro, S. M. **Anatomia Vegetal.** Viçosa, Ed. UFV.
- Silva, J.C.S. 1991. Fenologia de Espécies do Estrato Herbáceo-Arbustivo dos Cerrados, in: **Relatório Técnico anual do Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados,** Planaltina, DF, EMBRAPA-CPAC.
- Souza, V.C. 2005. **Botânica Sistemática:** Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, Baseado em APG II, Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum.
- Smith, L.B. & Ayensu, E.S.1974. Classification of Old World Velloziaceae. **Kew Bulletin** **29**: 181-205.
- Smith, L.B. & Ayensu, E.S.1976. A revision of American Velloziaceae. **Smithsonian Contributions to Botany** **30**: i-viii +1-172

- Sutter, E. & Langhans, R.W. 1982. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot tip culture. **Canadian Journal of Botany** **60**: 2896–2902.
- Wetzstein, H.Y. & Sommer, H.E. 1982. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (hamamelidaceae) during acclimatization. **American Journal of Botany** **69** (10): 1579-1586.
- Zobayed, S.M.A.; Armstrong, J. & Armstrong, W. 2001. Leaf anatomy of *in vitro* tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. **Plant Science** **161**: 537-548.