



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Botânica

**Propagação *in vitro* de *Jacaranda ulei* Bureau & K.  
Schum. (Bignoniaceae)**

**Wagner dos Santos Fukuda**

Brasília, DF

2011



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Botânica

**Propagação *in vitro* de *Jacaranda ulei* Bureau & K.  
Schum. (Bignoniaceae)**

**Wagner dos Santos Fukuda**

**Orientadora: Conceição Eneida dos Santos Silveira**

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

Brasília, DF  
Dezembro de 2011

**Membros da banca examinadora:**

---

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

---

**Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira**  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Membro titular

---

**Dr. Lúcio Flávio de Alencar Figueiredo**  
Departamento de Botânica, UnB  
Membro titular

---

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

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Nelson (*in memoriam*) e Leonor, que sempre me apoiaram em meus projetos.

À Professora Dra. Conceição Eneida dos Santos Silveira, pela paciência e inúmeras correções de rumo, por me aceitar como orientando e por transmitir seus conhecimentos valiosos sobre micropropagação.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília - UnB, que direta ou indiretamente contribuíram ou influenciaram no meu aprendizado durante o mestrado.

Aos colegas, amigos e estagiários do Laboratório de Cultura de Tecidos e do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica da UnB, em especial aos técnicos Elias e Daiane, que por muitos momentos estiveram comigo neste projeto.

Ao funcionário Mendes, cuja ajuda foi imprescindível no campo.

Ao Sr. Florisvaldo, responsável pela estufa do campus da UnB, pelo cuidado dedicado aos experimentos.

Aos colegas de mestrado, pelos inúmeros bons momentos em que compartilhamos conhecimentos e irreverência.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Finatec, Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos pelo financiamento do presente trabalho.

A empresa Odds & Actions pela revisão das análises estatísticas.

Enfim, a todos aqueles que estiveram e ainda estão comigo nesta jornada de conhecimento: família, professores, colegas, amigos, técnicos, o meu eterno muito obrigado.

# SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>ABREVIações</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
1. Características das plantas do Cerrado .....	04
2. Família Bignoniaceae .....	05
3. Gênero <i>Jacaranda</i> .....	08
3.1. Aspectos morfológicos .....	11
3.2. Importância econômica .....	12
4. <i>Jacaranda ulei</i> Bureau & K. Schum. ....	13
5. Cultura de tecidos .....	16
5.1. Micropropagação .....	18
5.1.1. Desinfestação .....	20
5.1.2. Fases da micropropagação .....	21
5.1.2.1. Fase de estabelecimento utilizando semente .....	21
5.1.2.2. Fase de multiplicação e subcultivos .....	22
5.1.2.2.1. Importância das citocininas e auxinas .....	22
5.1.2.2.2. Subcultivos .....	24
5.1.2.2.3. Meio de cultura .....	25
5.1.2.3. Fase de enraizamento .....	26
5.1.2.4. Fases de aclimatização e aclimatação .....	28
<b>OBJETIVOS</b>	
1. Objetivo geral .....	31
2. Objetivos específicos .....	31

## MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta do material vegetal .....	32
2. Beneficiamento e desinfestação das sementes .....	32
3. Fases da micropropagação.....	33
3.1. Fase de estabelecimento: inoculação de sementes .....	33
3.2. Fase de multiplicação .....	34
3.3. Fase de enraizamento .....	35
3.3.1. Experimento 1 - <i>in vitro</i> .....	36
3.3.2. Experimento 2 - <i>in vitro</i> .....	36
3.3.3. Experimento 3 - <i>ex vitro</i> .....	36
3.3.4. Enraizamento durante a fase de multiplicação <i>in vitro</i> .....	37
4. Aclimatização.....	37
4.1. Aclimatização em estufa .....	38
4.1.1. Plantas enraizadas <i>ex vitro</i> .....	38
4.1.2. Plantas enraizadas durante a fase de multiplicação .....	38
4.2. Casa de vegetação .....	38
5. Análise anatômica.....	39
6. Análise estatística .....	39

## RESULTADOS

1. Desinfestação, germinação e desenvolvimento da planta.....	40
2. Multiplicação e subcultivos .....	43
3. Enraizamento.....	50
3.1. Experimento 1 - <i>in vitro</i> .....	50
3.2. Experimento 2 - <i>in vitro</i> .....	53
3.3. Experimento 3 - <i>ex vitro</i> .....	53
3.4. Enraizamento durante a fase de multiplicação <i>in vitro</i> .....	57
3.5. Comparação do enraizamento <i>in vitro</i> , <i>ex vitro</i> , e na fase de multiplicação.....	59
4. Aclimatização .....	62
4.1. Estufa.....	62
4.1.1. Brotos enraizados <i>ex vitro</i> .....	62
4.1.1. Brotos enraizados durante a fase de multiplicação.....	63
4.2. Casa de vegetação .....	63

## **DISCUSSÃO**

1. Fase de estabelecimento.....	66
1.1. Desinfestação .....	66
1.2. Geminação e morfologia da plântula e da planta jovem .....	67
2. Fase de multiplicação .....	70
2.1. Efeito da diluição do meio MS.....	70
2.2. Multiplicação e subcultivos.....	71
3. Enraizamento e desenvolvimento da parte aérea .....	74
3.1. Enraizamento <i>in vitro</i> .....	75
3.2. Enraizamento <i>ex vitro</i> em estufa.....	76
3.3. Enraizamento durante a fase de multiplicação ( <i>in vitro</i> ) .....	78
3.4. Comparação do enraizamento <i>in vitro</i> , <i>ex vitro</i> , e na fase de multiplicação.....	79
4. Acclimatização e desenvolvimento de plantas xilopodióforas do Cerrado .....	79
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>104</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Tabela 1.** Espécies do gênero *Jacaranda* encontradas no Cerrado com seus respectivos hábitos e fitofisionomias ..... 09
- Tabela 2.** Porcentagem de germinação, período e condições para a emergência da plântula e período de viabilidade das sementes de algumas espécies do gênero *Jacaranda* (Bignoniaceae) ..... 10

### RESULTADOS

- Tabela 3.** Germinabilidade (%) no 30<sup>o</sup> dia de cultura e plantas normais (%) no 60<sup>o</sup> dia de cultura, em diferentes matrizes de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. .... 40
- Tabela 4.** Germinabilidade (%) de sementes *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., armazenadas por 6 meses e 12 meses, no 30<sup>o</sup> dia de cultura..... 42
- Tabela 5.** Número de brotos em *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. cultivada em meio de cultura contendo BAP (6-benzilaminopurina) e AIB (ácido 3-indol-butírico), em diferentes concentrações, totalizando nove tratamentos, em quatro subcultivos sucessivos de 60 dias cada ..... 44
- Tabela 6.** Comprimento dos brotos em *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. cultivada em meio de cultura contendo BAP (6-benzilaminopurina) e AIB (ácido 3-indol-butírico), em diferentes concentrações, totalizando nove tratamentos, em quatro subcultivos sucessivos de 60 dias cada ..... 46
- Tabela 7.** Enraizamento (%) e desenvolvimento do sistema radicular em brotos em *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. cultivada em meio ¼ MS com ou sem carvão ativado no 90<sup>o</sup> dia de cultivo ..... 51
- Tabela 8.** Sobrevivência (%) e características da parte aérea dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., durante o enraizamento, em meio ¼ MS com ou sem carvão ativado, no 90<sup>o</sup> dia de cultivo..... 51
- Tabela 9.** Enraizamento (%) e desenvolvimento do sistema radicular em brotos em *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. em vermiculita, sob condições de estufa, no 90<sup>o</sup> dia de cultivo..... 54
- Tabela 10.** Sobrevivência (%) e características da parte aérea dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., durante o enraizamento em vermiculita, sob condições de estufa, no 90<sup>o</sup> dia de cultivo ..... 54
- Tabela 11.** Enraizamento (%) e desenvolvimento do sistema radicular em *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. durante a fase de multiplicação *in vitro*, em todos os tratamentos com BAP/AIB, no 90<sup>o</sup> dia do 6<sup>o</sup> subcultivo ..... 58



<b>Tabela 12.</b> Sobrevivência (%) e características da parte aérea dos brotos de <i>Jacaranda ulei</i> Bureau & K. Schum., durante a fase de multiplicação em todos os tratamentos com BAP/AIB, no 90 <sup>o</sup> dia do 6 <sup>o</sup> subcultivo .....	59
<b>Tabela 13.</b> Comparação do enraizamento (%) e desenvolvimento do sistema radicular de <i>Jacaranda ulei</i> Bureau & K. Schum. em diferentes condições: durante a fase de multiplicação (BAP/AIB 0,0/0,0; 0,00/0,01 e 0,01/0,01 mg.L <sup>-1</sup> ), <i>in vitro</i> (meio sem carvão) e <i>ex vitro</i> (estufa), no 90 <sup>o</sup> dia de cultivo.....	61
<b>Tabela 14.</b> Comparação da sobrevivência (%) e das características da parte aérea dos brotos de <i>Jacaranda ulei</i> Bureau & K. Schum., durante o enraizamento em diferentes condições: durante a fase de multiplicação (BAP/AIB 0,0/0,0; 0,00/0,01 e 0,01/0,01 mg.L <sup>-1</sup> ), <i>in vitro</i> (meio sem carvão) e <i>ex vitro</i> (estufa), no 90 <sup>o</sup> dia de cultivo .....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Aspecto morfológico dos órgãos vegetativos e reprodutivos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae)..... 14
- Figura 2.** Aspecto morfológico dos órgãos vegetativos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae) crescendo em condições de campo..... 16

### RESULTADOS

- Figura 3.** Germinação, desenvolvimento da plântula e planta jovem de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), durante a fase de estabelecimento, em solução de água e ágar (8%)..... 41
- Figura 4.** Desenvolvimento da plântula de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), durante a fase de estabelecimento, em solução de água e ágar (8%), no 20º dia de cultivo..... 43
- Figura 5.** Aspecto dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), durante a fase de multiplicação, cultivados em ¼ MS com BAP/AIB (0,00; 0,01, 0,05 mg.L<sup>-1</sup>), no 60º dia de cultivo da 4º subcultivo..... 47
- Figura 6.** Aspecto morfológico dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), durante a fase de multiplicação, cultivados em ¼ MS com BAP/AIB 0,05/0,05 mg.L<sup>-1</sup>, no 60º dia do 4º subcultivo. a. Clone 12. b. Clone 8. Observe que quantidade de brotos por explante é muito maior no clone 12, embora o comprimento dos brotos sejam equivalentes nos dois clones..... 48
- Figura 7.** Aspecto morfológico dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), durante a fase de multiplicação, cultivados em ¼ MS com BAP/AIB 0,05/0,00 mg.L<sup>-1</sup>, no 60º dia do 4º subcultivo. .... 49
- Figura 8.** Aspecto morfológico dos brotos do clone 11 de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), durante a fase de multiplicação, cultivados em ¼ MS com BAP/AIB 0,01/0,05 mg.L<sup>-1</sup>, no 60º dia do 4º subcultivo..... 49
- Figura 9.** Desenvolvimento dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), durante a fase de enraizamento, em meio ¼ MS..... 52
- Figura 10.** Plantas de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), multiplicados *in vitro*, durante a fase de enraizamento *ex vitro*, em estufa, após 90 dias de cultivo em vermiculita ..... 55
- Figura 11.** Estudo anatômico de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), apresentado a região cambial (setas curtas), durante a fase de enraizamento *ex vitro*, em estufa, após 90 dias de cultivo em vermiculita ..... 56

- Figura 12.** Plantas de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae) multiplicados *in vitro* e enraizadas *ex vitro*, durante a fase de aclimatização em estufa, após 18 meses de cultivo em latossolo vermelho ..... 64
- Figura 13.** Plantas de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*. Fase de aclimatização em casa de vegetação, após 24 meses de cultivo em latossolo vermelho..... 65

## ABREVIações

AIB	ácido 3-indol-butírico
BAP	6-benzilaminopurina
B5	Meio de cultura formulado por Gamborg <i>et al.</i> 1968
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DF	Distrito Federal
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAL	Fazenda Água Limpa
Finatec	Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos
MCTI	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
MS	Meio de cultura formulado por Murashigue & Skoog 1962
ONU	Organização das Nações Unidas
PET	Politereftalato de etila - poliéster
SISVAR	Programa de análise estatísticas da Universidade Federal de Lavras – MG
TDZ	Thidiazuron - feniluréia
UnB	Universidade Brasília
UB	Herbário da Universidade de Brasília
WPM	Wood Plant Medium, meio de cultura formulado por Lloyd & McCown 1981

## RESUMO

Um protocolo de micropropagação foi desenvolvido para *Jacaranda ulei*, um importante subarbusto medicinal do Cerrado. A espécie também apresenta potencial ornamental pela cor vermelho-vináceo das flores e pela arquitetura peculiar dos foliólulos. As culturas foram iniciadas por segmentos nodais de plântulas provenientes de sementes de cinco matrizes. A germinação e o cultivo das sementes foram realizados *in vitro*, em água e ágar (8%), após a desinfestação, realizada por imersão em álcool 70%, hipoclorito de sódio (NaOCl) comercial (2-2,5% de cloro ativo) e três enxagues em água destilada autoclavada. Em todas as matrizes testadas a desinfestação das sementes foi acima de 95%. A germinabilidade foi elevada nas sementes recém-coletadas de quatro matrizes (acima de 90%). A porcentagem de plântulas normais foi elevada em todas as matrizes (acima de 90%). Nas sementes armazenadas por seis e doze meses, a germinabilidade foi baixa, respectivamente 47,9% e 29,2%. A germinação é epígea fanerocotiledonar e se inicia com a expansão da raiz primária. A morfologia da plântula e da planta jovem foi descrita até o 120<sup>o</sup> dia de cultivo. Os eofilos são pinados e com número crescente de foliólulos de três a sete. O desenvolvimento do sistema radicular é lento e sem diferenciação de raízes laterais no período observado. A formação de plântulas anormais ocorreu em todas as matrizes testadas e as anormalidades observadas estão relacionadas principalmente à má formação do sistema radicular, que comumente possui a região apical da raiz primária com sinais de necrose. Os segmentos nodais, provenientes de plântulas de 60 dias, foram cultivados em MS com macro e micro nutrientes diluídos a quarta parte ( $\frac{1}{4}$  MS) e BAP e AIB nas concentrações 0,0; 0,01 e 0,05 mg.L<sup>-1</sup>, em quatro subcultivos sucessivos de 60 dias cada, formando um fatorial 2x3x4. A indução e o alongamento dos brotos foram observados em todos os tratamentos, inclusive no controle, nos quatro subcultivos. No tratamento BAP/AIB 0,05/0,05 mg.L<sup>-1</sup> ocorreu maiores médias de multiplicação (2 brotos por explante) e comprimento (3,5 cm) dos brotos. Brotos provenientes do segundo e terceiro subcultivos foram enraizados *in vitro*, em  $\frac{1}{4}$  MS, com e sem carvão ativado, e *ex vitro*, em vermiculita. Após 90 dias de cultivo foi observado que o carvão inibiu totalmente o enraizamento. Em  $\frac{1}{4}$  MS, sem carvão, e *ex vitro*, respectivamente, 67% e 79% dos brotos enraizaram. A análise anatômica da base do caule na região na qual a raiz adventícia emerge, confirma que a vascularização da raiz está conectada à do caule e que o amido presente é hidrolisado durante a diferenciação da raiz. O enraizamento também foi observado aos 90 dias de cultivo, em todos os tratamentos com BAP/AIB, no 7<sup>o</sup> subcultivo. A maior porcentagem de enraizamento foi de 63%, em meio com 0,01 mg.L<sup>-1</sup> de AIB. Mais de 71% das plantas enraizadas foram aclimatizadas em estufa após 18 meses. Após 24 meses, 100% das plantas transferidas para casa de vegetação sobreviveram e começam a produzir folhas bipinadas, como a planta adulta.

Palavras-chave: micropropagação, germinação, plântula, morfologia, xilopódio.

## ABSTRACT

A micropropagation protocol has been developed for *Jacaranda ulei*, an important medicinal subshrub of Cerrado. This species has also potential as ornamental due to the vinaceous-red color of its flowers and the peculiar architecture of the leaflets. Seeds of five different mother-plants were germinated *in vitro*, and nodal segments taken from these seedlings were used to initiate the cultures. *In vitro* germination and cultivation was accomplished in water/agar (8%) medium, just after the seeds had been disinfested, which was performed by their immersion in 70% alcohol, commercial bleach (NaOCl, 2-2.5% active chlorine) and three washes in sterilized distilled water. Seeds from all five mother-plants tested had a disinfestation rate above 95%. The seed germination was higher in freshly collected seeds (above 90%). Independently of the origin, the percentage of normally developed seedlings was high (above 90%). When seeds were stored for six to twelve months, the germinability decreased and presented rates of 47.9% and 29.2%, respectively. *J.ulei* germination is epigealphanerocotylar and began with the protrusion of the primary root. Seedling and young plant morphology was described using specimens grown for up to 120 days. Eophylls were pinnate, and the number of leaflets increased from three to seven. The development of the root system was relatively slow and there was no differentiation of lateral roots during the observation period. The formation of abnormal seedlings did occur from seeds of all mother plants, and the most common abnormalities were related to an impaired root system formation, which was manifested by necrosissigns in the root tip region. Nodal segments from 60-day old seedlings were grown in  $\frac{1}{4}$  MS with BAP and IBA (0.0, 0.01 and 0.05 mg.L<sup>-1</sup>) in four successive subcultures of 60 days each, which formed a 2x3x4 factorial. Shoot induction and elongation was observed in all treatments, including the control, in all four subcultures. The treatment BAP-IBA that contained 0.05-0.05 mg.L<sup>-1</sup> showed the highest multiplication average (2 shoots/explant), as well as the highest shoot length (3.5 cm). Shoots from the second and third subcultures rooted *in vitro* in  $\frac{1}{4}$  MS medium, with or without activated charcoal, and also *ex vitro*, in vermiculite. After 90 days of culture, it was observed that the activated charcoal completely inhibited rooting. Shoot rooting rates in  $\frac{1}{4}$  MS without activated charcoal as well as *ex vitro* were 67% and 79%, respectively. The anatomical analysis of stem basal region, where the adventitious root rose, confirmed that the root vasculature was connected to that of the stem, and the starch was hydrolyzed during the differentiation of the root. Shoot rooting was also observed at 90 days of culture, in all treatments with BAP-IBA (7<sup>th</sup> subculture). The highest rooting percentage was 63% in medium with 0.01 mg.L<sup>-1</sup> of IBA. After 18 months, over 71% of rooted plants had been acclimatized in a greenhouse, and after 24 months, 100% of the plants transferred to the greenhouse survived and began to produce leaves bipinnate, such as those seen in mature plant.

Keywords: micropropagation, germination, seedling morphology, xylopodium.

## INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, o bioma Cerrado diminuiu em quase metade sua extensão (Sano *et al.* 2010; IBGE 2010), devido à ocupação acelerada e desordenada, principalmente com a exploração de áreas agrícolas e pastagens (Klink & Machado 2005).

Contudo, a biodiversidade do Cerrado oferece uma ampla variedade de produtos que pode proporcionar meios de vida sustentáveis, com geração de renda e qualidade de vida, aliada à preservação dos recursos ambientais (Hironaka 2000; Sawyer *et al.* 1999).

Neste contexto, estudos das plantas nativas podem auxiliar a compreensão de mecanismos fisiológicos que possibilitem a exploração racional das propriedades apresentadas pelos vegetais, cuja importância pode ser ecológica, agrônômica ou medicinal (Vidal *et al.* 1999).

Estudos etnobotânicos confirmam a riqueza da flora medicinal do Cerrado (Rodrigues & Carvalho 2001; Silva & Proença 2008). Dentre as espécies medicinais destaca-se *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., um importante subarbusto popularmente conhecido como carobinha e carobinha-do-campo (Farias *et al.* 2002; Marcondes & Oliveira 2011). O porte da planta e as características das folhas, juntamente com a cor vermelho-vináceo das flores, também conferem potencialidades ornamentais para a espécie.

As folhas e as raízes de *J. ulei* são utilizadas na medicina popular para tratar diversos males como reumatismo e dores na coluna, além de depurativo do sangue (Barros 1981; Mattos 1996; Barbosa 2010). Revistas de ampla circulação com foco no uso medicinal e tradicional de plantas medicinais, como “Ervas & Plantas que Curam” (Editora Escala), ressaltam a utilização da espécie no tratamento do vitiligo e colite com diarreia. A importância desta espécie é demonstrada pela comercialização de suas folhas em farmácias homeopáticas, com indicação para tratamento de disenteria amebiana, afecções da pele e vias urinárias. Segundo levantamento realizado com raizeiros de Campo Grande, MS, *J. ulei* é também indicada para tratar inflamações na próstata e ovário, alergias, sarna, sífilis, prisão de ventre, disfunções no fígado, além de depurar o sangue e reduzir o colesterol (Nunes *et al.* 2003). Na medicina veterinária esta planta foi citada como uma das espécies mais indicadas para o tratamento de sinais clínicos e/ou doenças em seis das oito categorias de uso elencadas (desordens

dos sistemas tegumentar, músculo-esquelético, digestório, metabólico e endócrino, doenças infecciosas e parasitárias e processos inflamatórios) confirmando sua atividade terapêutica em animais (Marcondes & Oliveira 2011).

Diversas espécies do gênero *Jacaranda* são utilizadas medicinalmente (Rahmatullah *et al.* 2010). Das folhas de *J. caroba* (Vell) DC, são preparados chás, indicados no tratamento do reumatismo, sífilis, doenças da pele e como tônico corporal. Além disso, a casca da raiz tem ação sudorífera e a casca do caule é adstringente, diurética e também anti-sifilítica (Rodrigues & Carvalho 2001). Já as folhas e a casca do caule de *J. decurrens* Cham. são utilizadas como depurativo e nas afecções cutâneas, e as folhas secas, na forma de cataplasmas, no tratamento de úlceras externas (Rodrigues & Carvalho 2001). Testes *in vitro* verificaram a atividade de extratos de *Jacaranda caucana* Pittier em protozoários causadores de malária e leishmaniose (Weninger *et al.* 2001; Gachet & Schühly 2009).

As propriedades medicinais das *Jacaranda* ocorrem provavelmente pela presença, nos diversos órgãos da planta, de substâncias bactericidas (Arruda *et al.* 2011), anticancer (Ogura *et al.* 1976; 1977a), fenóis (Santos *et al.* 2010), flavonóides (Ferguson & Lien 1982; Martins *et al.* 2008), antocianinas (Fernandes 1968; Billot 1974), terpenos (Ogura *et al.* 1977b), quinonas (Subraman *et al.* 1973; Martins *et al.* 2008), polissacarídeos (Singh 1997), entre outras (Dayal & Seshadri 1979; Prakash & Garg 1980).

Estudos sobre a propagação e cultivo são fundamentais para assegurar a domesticação e o aproveitamento sustentável de plantas do Cerrado. Técnicas de propagação *in vitro*, com destaque à micropropagação, têm permitido a rápida multiplicação e clonagem de muitas espécies lenhosas medicinais (Mercier *et al.* 1992; Castro *et al.* 2007; Silva *et al.* 2008; Nicioli *et al.* 2008; Srivastava *et al.* 2010; Chinnappan *et al.* 2011; Oliveira *et al.* 2011). Essas técnicas têm sido úteis para espécies que, em condições de viveiro, apresentam baixa germinabilidade ou que a propagação vegetativa clássica seja limitada pela baixa aptidão dos propágulos ao enraizamento. Essas dificuldades são refletidas pela escassez de literatura sobre técnicas de propagação em espécies do Cerrado. Neste sentido, os poucos trabalhos publicados até o momento (Silva Rios *et al.* 2001; Oliveira *et al.* 2001) indicam espécies que apresentam potencial para o enraizamento, mas que, de maneira geral, não apresentaram bons resultados, isso é, bem abaixo de 50% (Silva Rios *et al.* 2001, Leite *et al.* 2007).



Embora a utilização de órgãos medicinais de *Jacaranda* seja comum, não existem plantios comerciais, sugerindo que este material é coletado de forma extrativista. Considerando que em muitas espécies desse gênero os princípios ativos ocorrem nas entrecascas, raízes e xilopódios, a sobrevivência das plantas é ainda mais comprometida pela coleta (Martins *et al.* 2011).

Assim, o presente trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo para a micropropagação de *Jacaranda ulei*, por meio de sementes germinadas *in vitro*.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Características das plantas do Cerrado

O Bioma Cerrado abrange em torno de 2,5 milhões de km<sup>2</sup> do território brasileiro (Silva *et al.* 2006), representando 22% do total do território nacional (Ratter 1992). Por apresentar esta grande abrangência, está submetido a diferenças de clima, relevo e solos e apresenta uma ampla gama de formações vegetais (Oliveira-Filho & Ratter 2002).

Nas diversas fitofisionomias do bioma, destaca-se o Cerrado sentido restrito, o qual se caracteriza pela presença dos estratos arbóreo e arbustivo-herbáceo definidos, com as árvores distribuídas aleatoriamente em diferentes densidades, sem que se forme um dossel contínuo (Ribeiro & Walter 2008). Representa a segunda maior formação vegetal brasileira com mais de 11 mil espécies vasculares de plantas superiores nativas (Mendonça *et al.* 2008), sendo considerada uma das floras mais ricas e diversas do mundo (Klink 1996).

Dentre as características peculiares de muitas plantas do Cerrado está a existência de órgãos subterrâneos, nos quais são armazenados água e nutrientes. Estes órgãos são adaptações que permitem a esta vegetação resistir às secas e às queimadas periódicas a que são submetidas, protegendo as plantas da destruição e capacitando-as para rebrotar (Rizzini & Heringer 1961; Apezato-da-Glória 2003).

Cerca de cinquenta por cento da vegetação herbácea e subarbusciva do Bioma Cerrado apresenta órgão subterrâneo espessado, o que sugere a importância ecológica dessas estruturas (Mantovani & Martins 1988). A existência de estruturas subterrâneas está estritamente relacionada à sobrevivência das

espécies em condições adversas do ambiente, já que favorecem a regeneração das plantas. O conhecimento da estrutura (Palhares *et al.* 2007a-b) e do funcionamento dos mecanismos de sobrevivência é fundamental para a propagação vegetativa de espécies de interesse econômico (Hayashi 2003).

No momento atual, considerando as modificações climáticas mundiais e suas consequências, a adoção de práticas que favoreçam a manutenção ou o acúmulo de carbono no sistema solo-planta podem atenuar os efeitos do aquecimento global (Carvalho *et al.* 2010). Nesse contexto, destacam-se a conservação da vegetação e a utilização de técnicas adequadas de manejo. Embora nas diferentes fitofisionomias do Cerrado não preponderem à ocorrência de florestas densas, a grande extensão da vegetação e dos sistemas subterrâneos, com raízes profundas (Palhares & Silveira 2006) e amplo desenvolvimento lateral, aumentam a capacidade do Bioma de armazenar carbono e não devem ser negligenciadas (Sawyer 2002; Hogan *et al.* 2002).

Diante do exposto, apesar da representatividade de sua extensão, elevada biodiversidade, e suas singularidades estruturais, o Cerrado vem sendo submetido, ao longo das últimas décadas, a um rápido processo de degradação ambiental (Ribeiro *et al.* 2005), sendo considerado um dos 34 *hotspots*, áreas prioritárias para conservação da biodiversidade mundial (Mittermeier *et al.* 2005).

## **2. Família Bignoniaceae**

A família Bignoniaceae é constituída por 113 gêneros e 800 espécies de plantas arbustivas, arbóreas e trepadeiras (Gentry 1980; 1990). Estas espécies estão distribuídas nas regiões tropicais de todo o mundo, sendo de ocorrência frequente no continente americano, cujos gêneros *Jacaranda* e *Tabebuia* são os

exemplares mais representativos da família. O centro de dispersão desta família está no Brasil, onde estão presentes 56 gêneros e 338 espécies, segundo Gentry 1980, e 32 gêneros e 391 espécies, segundo Lohmann 2012. Ocorrem desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul, sendo encontradas na Mata Atlântica, na região Amazônica e no Cerrado (Lorenzi 1998), onde possui grande número de representantes.

Entretanto, segundo Joly (1983) e Barroso *et al.* (1991), a família Bignoniaceae compreende cerca de 120 gêneros, com 650 espécies pantropicais, predominantemente neotropicais e poucas distribuídas nas regiões temperadas. Para Lohmann & Ulloa (2007) são aproximadamente 82 gêneros e 827 espécies com hábito arbóreo, arbustivo, trepador e, mais raramente, herbáceo, encontrados em áreas tropicais e subtropicais.

Tradicionalmente, consideram-se 8 tribos pertencentes à família: Tecomae, Oroxyleae, Bignonieae, Eccremocarpeae, Tourretieae, Colleae, Crescentieae e Schlegelieae (Gentry 1980; Barroso *et al.* 1991). Porém, de acordo com o APG III (2009) as relações com a ordem Lamiales não estão bem definidas. Estudos filogenéticos suportam a monofilia da família com a exclusão da tribo Schlegelieae e do gênero *Paulownia* (Spangler & Olmstead 1999). Estudos recentes sobre a filogenia molecular do grupo também apresentaram oito tribos, porém com algumas denominações diferentes (Jacarandaeae, Tourrenttieae, Tecomeae, Bignonieae, Catalpeae, Oroxyleae, Crescentieae e Coleae) e com indicação de que algumas destas tribos não são monofiléticas, sugerindo novos estudos para classificá-las (Olmstead *et al.* 2009).

Das oito tribos, três (Crescentieae, Tecomeae e Bignoniaceae), possuem representantes na flora brasileira (Barroso *et al.* 1991). Segundo Barroso *et al.* (1991), *Jacaranda* pertence à tribo Tecomeae, com ocorrência predominante na

América do Sul, porém, também na África e na Ásia e, em menor número de espécies, na América do Norte e Central, Antilhas, Madagascar e Austrália. Entretanto, após Olmstead *et al.* (2009) esse gênero passa a pertencer a tribo Jacarandaeae.

De modo geral, são plantas lenhosas, predominantemente lianas, porém certos gêneros apresentam também espécies com porte variando de arbóreo a subarbustivo, como por exemplo, em *Jacaranda*, ou predominantemente arbóreo, como em *Tabebuia* (Barroso *et al.* 1991).

Gentry (1980) observa que quase todas as espécies dessa família dependem de animais para formar frutos, pois a maioria das espécies é auto-incompatível, isto é, a planta fértil é incapaz de formar sementes quando polinizada pelo seu próprio pólen (Schifino-Wittmann & Dall'Agnol 2002). O trabalho de polinização é realizado por morcegos, beija-flores, esfingídeos, borboletas e principalmente abelhas de médio e grande porte (Gentry 1974; Frankie *et al.* 1983).

Em *Arrabidaea conjugata* (Vell.) Mart., experimentos manuais de autopolinização e polinização cruzada (xenogamia) apresentaram respectivamente 0% e 38% de sucesso, enquanto que a polinização natural apresentou 12%. Estes resultados indicam que a espécie é auto-incompatível e xenogâmica obrigatória, com pilhagem primária de néctar realizada por abelhas, e secundária, por borboletas e beija-flores (Correia *et al.* 2005).

As flores de Bignoniaceae, em geral, são vistosas, apresentam as pétalas fusionadas formando um tubo e os filetes são fusionados com a corola. O néctar é produzido na base da flor, os quais determinam que os visitantes florais devem ser anatomicamente (peças bucais) capazes de alcançar a câmara nectarífera (Carvalho *et al.* 2007).

### 3. Gênero *Jacaranda*

*Jacaranda*, pertencente à tribo Tecomeae, possui cerca de 47 espécies (Gentry 1979), que podem ter hábito arbóreo, arbustivo, subarbustivo ou trepador (Barroso *et al.* 1991). Nas diversas fitofisionomias do Cerrado são encontradas 20 espécies (Tabela 1).

Tradicionalmente, a propagação de *Jacaranda*, tem sido realizada por sementes. A Tabela 2 apresenta as condições de germinação de algumas espécies do gênero.

De acordo com a tabela 2 todas as espécies estudadas por Lorenzi (1992) apresentam elevada porcentagem de germinação (cerca de 80%) em sementes coletadas entre 3 e 4 meses, indicando que as sementes são recalcitrantes, isto é apresentam período de viabilidade restrito. Em *J. ulei* esta porcentagem é inferior, ficando entre 39 e 77%, como apresentado na tabela 2. Entretanto, as condições e o período de armazenamento não foram especificados.

**Tabela 1.** Espécies do gênero *Jacaranda* encontradas no Cerrado com seus respectivos hábitos e fitofisionomias (Mendonça *et al.* 2008).

<b>Espécie</b>	<b>Hábito</b>	<b>Fitofisionomia / Habitat</b>
<i>Jacaranda acutifolia</i> Humb. & Bonpl	árvore	mata de galeria
<i>Jacaranda brasiliana</i> (Lam.) Pers.	árvore	mata de galeria, cerrado, mata seca decídua
<i>Jacaranda caroba</i> (Vell.) A . D.C.	árvore	mata de galeria, cerrado
<i>Jacaranda copaia</i> ( Aubl.) D. Don	árvore	mata de galeria
<i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart. ex A. DC.	árvore	mata seca, cerrado
<i>Jacaranda decurrens</i> Cham.	subarbusto	cerrado
<i>Jacaranda intricata</i> A. Gentry & W. Morawetz	arbusto	campo rupestre
<i>Jacaranda jasminioides</i> (Thunb.) Sandw.	arbusto	cerrado, cerrado <i>lato sensu</i>
<i>Jacaranda morii</i> A. Gentry	arbusto	cerrado
<i>Jacaranda mutabilis</i> Hassler	arbusto	cerrado
<i>Jacaranda oxyphylla</i> Cham.	arbusto	cerrado, mata de galeria, campo limpo
<i>Jacaranda paucifoliolata</i> Mart. ex A. DC	arbusto	cerrado, campo limpo, campo sujo
<i>Jacaranda praetermissa</i> Sandw.	árvore	cerrado
<i>Jacaranda puberula</i> Cham.	árvore	mata de galeria, cerrado
<i>Jacaranda pulcherrima</i> W. Morawetz	árvore	cerrado, campo
<i>Jacaranda racemosa</i> Cham.	subarbusto	campo rupestre
<i>Jacaranda rufa</i> Manso	arbusto	cerrado, cerradão, campo sujo
<i>Jacaranda simplicifolia</i> K. Schum.	arbusto	Cerrado
<i>Jacaranda tomentosa</i> R. Br.	arbusto	mata de galeria, cerrado, campo
<i>Jacaranda ulei</i> Bureau & K. Schum.	subarbusto	cerrado ralo, mata, cerrado

**Tabela 2.** Porcentagem de germinação, período e condições para a emergência da plântula e período de viabilidade das sementes de algumas espécies do gênero *Jacaranda* (Bignoniaceae).

Espécie	Germinação		Período de viabilidade das sementes	Referência
	Porcentagem e emergência da plântula	Condições		
<i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart.	superior a 80%	12-15 dias sementeiras	até 4 meses	Lorenzi 1992
<i>Jacaranda macrantha</i> Cham.	geralmente alta	10-20 dias sementeiras	inferior a 4 meses	Lorenzi 1992
<i>Jacaranda mimosaeifolia</i> D. Don.	14%	42 dias <i>in vitro</i> , ágar e água	-	Maruyama 2003
<i>Jacaranda puberula</i> Cham.	superior a 80%	8-15 dias sementeiras	bastante curta, não ultrapassando 3 meses	Lorenzi 1992
<i>Jacaranda ulei</i> Bureau & K. Schum.	55 a 60%	- vermiculita umedecida com água	-	Wetzel 1997
<i>Jacaranda ulei</i> Bureau & K. Schum.	77%	iniciada aos 9 dias placa de petri	-	Ribeiro 2003
<i>Jacaranda ulei</i> Bureau & K. Schum.	71%	25 dias placa de petri	-	Noleto <i>et al.</i> 2003
	57%	25 dias <i>in vitro</i> , ágar e água	-	
	70%	25 dias <i>in vitro</i> , phytigel e água	-	
	39%	30 dias <i>in vitro</i> , plataforma de papel e água	-	
<i>Jacaranda ulei</i> Bureau & K. Schum.	51%	30 dias plataforma de papel e solução de 1 mg.L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub>	-	Silva <i>et al.</i> 2005



### 3. Aspectos morfológicos

Morfologicamente, as jacarandas estudadas apresentam folhas opostas e compostas que podem ser biterpenas, triterpenas, pinadas ou bipinadas (Barroso *et al.* 1991), imparipinada ou paripinada (Costa *et al.* 2011). As flores, organizadas em racemos axilares ou terminais (Barroso *et al.* 1991), são grandes e vistosas, diclamídeas, hermafroditas, pentâmeras, de simetria zigomorfa, com corola ligeiramente bilabiada (Joly 1983) e coloração variando de roxa, com em *J. puberula*, a púrpura, em *J. ulei*. O androceu é constituído por quatro estames férteis didínamos, com uma das tecas não desenvolvida, e um estaminódio muito desenvolvido e glandular. O ovário é súpero, bicarpelar, bilocular e muitos óvulos e placenta sempre bipartida (Joly 1983; Barroso *et al.* 1991). Todas essas características são típicas da família Bignoniaceae. Porém ressalta-se que estudos mais recentes, realizados em outros gêneros, apresentaram algumas diferenças, como em *Pyrostegia venusta*, da mesma família, cujos quatro estames são homodínamos e o ovário unilobular (Gonçalves *et al.* 2009).

Os frutos são capsulares, secos, com ápices e base obtusos, deiscência perpendicular ao eixo seminífero, como nos demais representantes da tribo, porém com sementes dispostas paralelamente ao plano de deiscência da cápsula, o que deve facilitar a dispersão das sementes (Barroso *et al.* 1999). As sementes são de tamanho e volumes médios, com textura corticosa e alas reduzidas (Barroso *et al.* 1999). Desconsiderando as alas, possuem entre 4 e 12 mm, dependendo da espécie.

### 3.2. Importância econômica

As plantas deste gênero são muito utilizadas na construção civil, carpintaria e confecção de instrumentos musicais devido à natureza rígida da madeira. No paisagismo urbano são usadas na ornamentação, devido à beleza de suas florações (Lorenzi 1998).

Algumas espécies de *Jacaranda* têm sido utilizadas com sucesso em sistemas agroflorestais tanto na Amazônia brasileira (Brienza-Jr *et al.* 1991) quanto na equatoriana (Peck & Bishop 1992). No México, *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don. está sendo utilizada na ornamentação de jardins públicos. A população local usa as flores desta espécie na forma de chá, para dores em geral (Pérez-Gutiérrez *et al.* 1994). No Brasil é conhecida por Jacarandá-mimoso e é muito utilizada na arborização, principalmente na região sul (Socolowski & Takaki 2004).

Diversas espécies do gênero são utilizadas medicinalmente (Rahmatullah *et al.* 2010). Das folhas de *J. caroba* (Vell) DC, são preparados chás, indicados no tratamento do reumatismo, sífilis, doenças da pele e como tônico. Além disso, a casca da raiz tem ação sudorífera e a casca do caule é adstringente, diurética e também anti-sifilítica (Rodrigues & Carvalho 2001). Já as folhas e a casca do caule de *J. decurrens* Cham. são utilizadas como depurativo e nas afecções cutâneas, e as folhas secas, na forma de cataplasmas, no tratamento de úlceras externas (Rodrigues & Carvalho 2001). Testes *in vitro* verificaram a atividade de extratos de *Jacaranda caucana* Pittier em protozoários causadores de malária e leishmaniose (Weninger *et al.* 2001; Gachet & Schühly 2009).

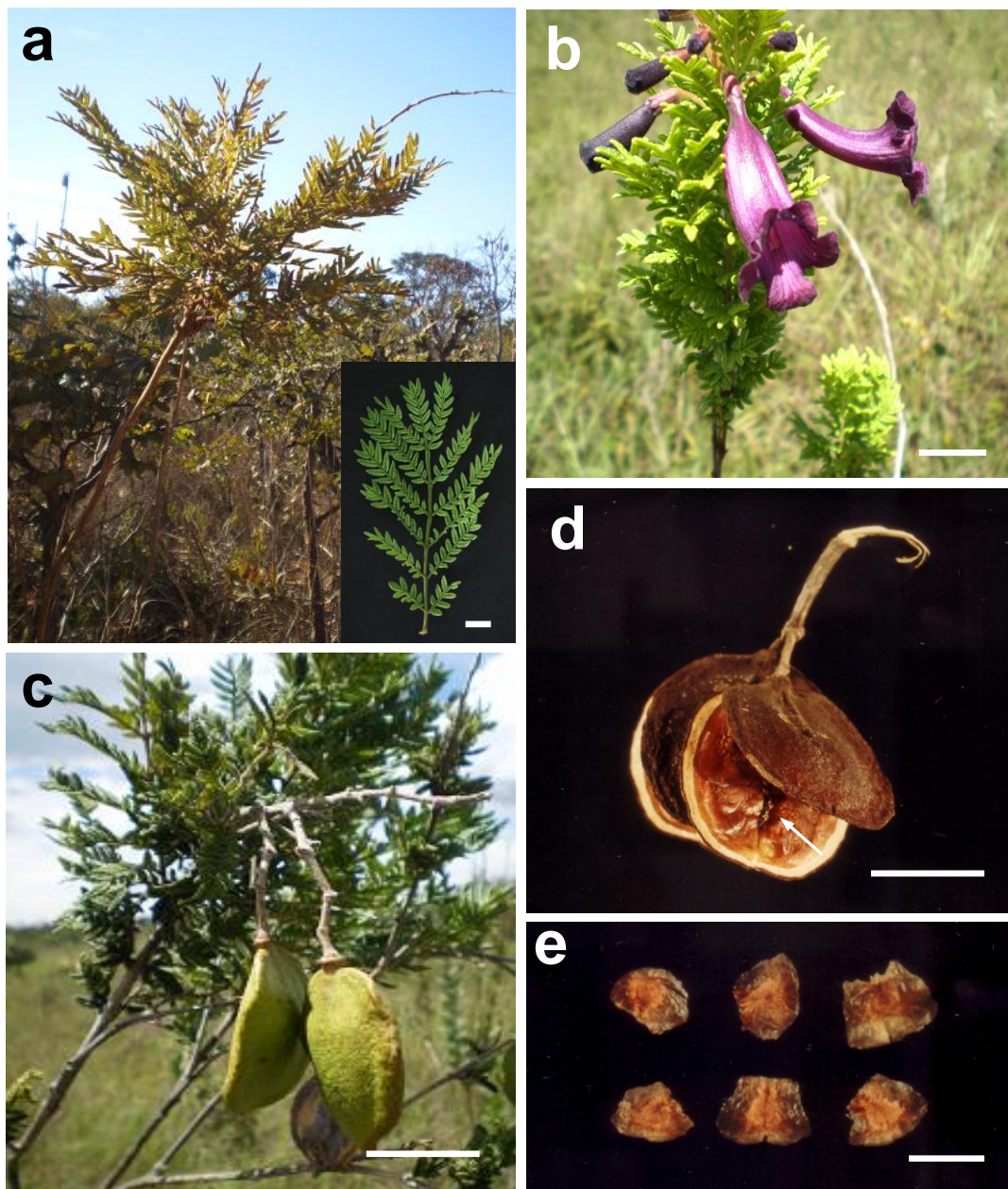
As propriedades medicinais das diferentes espécies do gênero ocorrem provavelmente pela presença, nos diversos órgãos da planta, de substâncias bactericidas (Arruda *et al.* 2011), anticancerígenas (Ogura *et al.* 1976, 1977a), fenois (Santos *et al.* 2010), flavonóides (Ferguson & Lien 1982; Martins *et al.* 2008), antocianinas (Fernandes 1968; Billot 1974), terpenos (Ogura *et al.* 1977b), quinonas (Subraman *et al.* 1973; Martins *et al.* 2008), polissacarídeos (Singh 1997), entre outras (Dayal & Seshadri 1979; Prakash & Garg 1980).

#### **4. *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum.**

*Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Figuras 1 e 2) é uma espécie subarbustiva (Figura 1a), nativa do Cerrado (Mendonça *et al.* 2008), popularmente conhecida como caroba (Barros 1981), carobinha-do-campo e carobinha (Farias *et al.* 2002). As folhas são compostas bipinadas (Figura 1a), com tricomas na face abaxial dos foliólulos, os quais são bulados, isso é, possuem nervuras que marcam o limbo foliar (Farias *et al.* 2002).

É utilizada na medicina popular para tratar problemas de reumatismo e dores na coluna (Barros 1981; Mattos 1996). Revistas especializadas, como “Ervas que Curam” (Editora Escala), também indicam a espécie para os tratamentos do vitiligo e colite com diarreia. As folhas de *J. ulei* são comercializadas em farmácias homeopáticas, que as indicam para disenteria amebiana, afecções da pele e vias urinárias. Segundo levantamento realizado com raizeiros de Campo Grande, MS, em 1992 e 2002, *J. ulei* é também indicada para tratar inflamações na próstata e ovário, alergias, sarna, sífilis, prisão de

ventre, disfunções no fígado, além de depurar o sangue e reduzir o colesterol (Nunes *et al.* 2003).

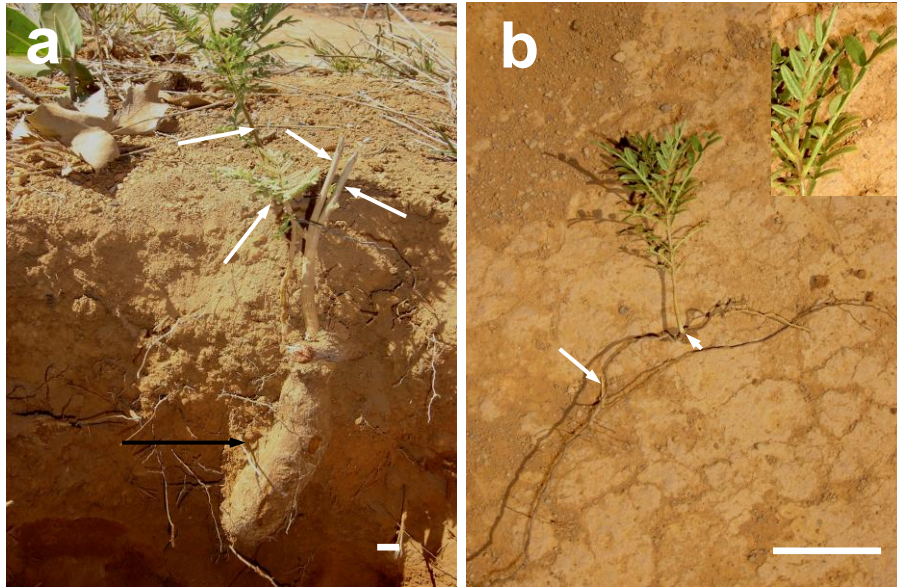


**Figura 1.** Aspecto morfológico dos órgãos vegetativos e reprodutivos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae). a-c. Planta crescendo em condições de campo. a. Planta apresentando porte subarbustivo. Detalhe da folha adulta, bipinada e imparipinada. b-c. Indivíduos adultos, em fase de floração (outubro 2009), com inflorescência e flores vistosas (b) e frutificação (maio 2009), com frutos imaturos (c). d. Fruto aberto apresentando região de deiscência e placentação axial (seta). e. Detalhe das sementes aladas. Barra = 2 cm.

Além da ação terapêutica, a espécie apresenta grande potencial ornamental, devido à tonalidade do verde de suas folhas e da coloração púrpura das suas flores (Figura 1b). Os frutos (Figuras 1 c-d) possuem sementes (Figura 1e) grandes (cerca de 2 cm), com alas translúcidas, tegumento glabro de cor marrom-escuro-opaco, formato entre arredondado e elíptico, e tornando-se achatada no ápice e na base (Ribeiro 2003).

A observação de plantas de *J. ulei*, crescendo no campo, evidencia a capacidade de emitir brotações de estruturas subterrâneas (Figuras 2 a-b), como outras espécies do Cerrado (Rizzini & Heringer 1961; Appezzato-da-Glória 2003, Vilhalva & Appezzato-da-Glória 2006; Palhares & Silveira 2006; Appezzato-da-Glória & Cury 2011). Observou-se, preliminarmente, a formação de uma tuberosidade, a qual, pelas características morfológicas, assemelha-se a um xilopódio (Figura 2a), a qual não é relatada na literatura para a espécie.

Em campo, também foi observado que as jovens brotações, emitidas a partir de raízes laterais, apresentam folhas compostas e não possuem tuberosidade na base (Figura 2b), diferentemente da planta adulta. É comum que brotações produzidas a partir de indivíduos adultos apresentem características juvenis (Hackett 1988; Perrando & Corder 2006), como a posição de crescimento dos ramos (Wendling *et al.* 2009) e morfologia das folhas (Silveira 1994; Silveira & Cottignies 1994). Estudos sobre a ontogênese de plântulas e plantas jovens (Oliveira 2001; Silveira *et al.* 2012), inexistentes para a espécie, são necessários para caracterizar os diferentes estágios do desenvolvimento de *J. ulei*. Estes estudos também são importantes para avaliar se a morfologia das plantas produzidas por cultura de tecidos é semelhante à das plantas produzidas em condições naturais.



**Figura 2.** Aspecto morfológico dos órgãos vegetativos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae) crescendo em condições de campo. a. Ocorrência de tuberosidade (seta preta) e brotações (setas brancas) se desenvolvendo a partir da parte superior da tuberosidade. b. Jovem brotação regenerada a partir de raiz lateral (seta branca) de planta adulta. Observe a ausência de espessamento na base (cabeça de seta), característico da formação de tuberosidade, e detalhe das folhas compostas de 7, 9 e 11 folíolos. Barra = 2 cm.

## 5. Cultura de tecidos

A cultura de tecidos vegetais *in vitro* é uma técnica que estuda o crescimento de células, tecidos ou órgãos isolados de uma planta mãe em meio artificial (George 2008). Em teoria, qualquer fragmento vegetal pode ser utilizado devido à totipotência das células vegetais (Buvat 1944 apud Grattapaglia & Machado 1998). Explantes, como gemas, pedaços de caule ou de folha, embriões, cotilédones e grãos de pólen são inoculados e cultivados em condições assépticas (Melo *et al.* 2008).

Suas aplicações são diversas: limpeza clonal, conservação de germoplasma, obtenção de haplóides para o melhoramento genético (Ferreira *et*

al. 1998), produção de plantas com elevada qualidade sanitária (Souza *et al.* 2006), clonagem de genótipos superiores obtidos em programas de melhoramento (Bertozzo & Machado 2010), redução no período de juvenilidade (Coelho *et al.* 1998), entre muitas outras.

Atualmente, plantas de interesse econômico vêm sendo amplamente propagadas *in vitro* por laboratórios comerciais. Destacam-se as plantas ornamentais, principalmente herbáceas, que, de maneira geral, apresentam alta taxa de propagação e rápido desenvolvimento até a comercialização. Comparativamente com as herbáceas, as plantas lenhosas são mais dificilmente propagadas *in vitro* (Teixeira 2001; Giri *et al.* 2004), e, por esta razão, até os dias atuais ainda permanece reduzido o número de espécies arbustivas e arbóreas comercialmente propagadas por cultura de tecidos.

Diversas são as técnicas utilizadas para propagar tecidos vegetais. A escolha de uma, em detrimento de outra, está relacionada com objetivo a ser alcançado e com o explante inicial. Atualmente a micropropagação é a técnica que tem despertado maior interesse para propagação de plantas do Cerrado (Melo *et al.* 2008). Este fato é justificado pelos inúmeros protocolos de micropropagação estabelecidos com sucesso, ou que têm apresentando resultados parciais promissores, para as espécies cultivadas no Cerrado, como *Musa* sp. (Álvares & Caldas 2002; Matsumoto 2006), *Saccharum officinarum* L. (Garcia *et al.* 2007) e *Ananas comosus* L. Merrill (Teixeira *et al.* 2001), ou nativas deste Bioma, como *Stryphnodendron polyphytum* Mart. (França *et al.* 1995), *Annona muricata* L. (Lemos & Blake 1996), *Hancornia speciosa* Gomez (Grigoletto *et al.* 1996, Grigoletto 1997), *Tournefortia cf paniculata* Cham.

(Bertolucci *et al.* 2000), *Caryocar brasiliense* Camb. (Santos *et al.* 2006), *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. (Martins *et al.* 2011), entre outras.

Para as espécies do Cerrado, as técnicas de cultura de tecidos são indicadas principalmente quando suas características botânicas impedem ou dificultam a propagação pelas vias clássicas (Melo *et al.* 2008).

### **5.1. Micropropagação**

A multiplicação vegetativa *in vitro*, também denominada micropropagação tem como principal objetivo reproduzir plantas idênticas à planta-matriz, a partir da qual foram retirados os explantes. Este termo foi originalmente definido por Hartmann & Kester (1984), como todo o processo, em condições assépticas ou não, utilizando tecidos ou células vegetais com a finalidade de produzir novas plantas, sem a utilização da via sexuada (Hartmann *et al.* 2002).

Desta forma, a multiplicação pode ser realizada através da proliferação de gemas apicais ou axilares (Silva *et al.* 2008; Xing *et al.* 2010), da indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta (Hazra *et al.* 1989; Garcia *et al.* 2011) e da embiogênese somática (Das 2011). Entretanto, Melo *et al.* (2008) definiram o termo micropropagação *sensu stricto*, para a inoculação e cultivo de segmentos de caule contendo a gema apical ou gemas axilares em meio nutritivo. Na realidade, esta prática, é a única que assegura fidelidade genética das plantas multiplicadas *in vitro* e que tem sido empregada para a propagação comercial em larga escala (Giri *et al.* 2004). Neste trabalho, o termo micropropagação será empregado para designar micropropagação *sensu stricto*.



Em 1974, Murashige definiu três estágios para a multiplicação de plantas *in vitro*, conhecidos como Sistemas de micropropagação (Grattapaglia & Machado 1998; George & Debergh 2008): Estágio I – Seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas; Estágio II – multiplicação de propágulos mediante sucessivos subcultivos em meio próprio para multiplicação; Estágio III – transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas para substrato ou solo.

Este processo foi rapidamente adotado em laboratórios comerciais e de pesquisa em cultura de tecidos, pois além de descrever os estágios da micropropagação, também determinam os pontos nos quais as condições de cultivo precisam ser modificadas (George & Debergh 2008).

Além das condições de cultivo, vários outros fatores influenciam no sucesso do protocolo de micropropagação. Dentre eles podemos destacar: a época de coleta, o estado fisiológico e fitossanitário da planta matriz e do explante no momento da coleta, o tipo de explante, o protocolo de desinfestação, o isolamento e o tamanho dos explantes, as condições de incubação, a manipulação dos explantes nos subcultivos, entre outros (Silveira 1994; Silveira & Cottignies 1994; Grattapaglia & Machado 1998).

Abaixo, serão discutidos os fatores preponderantes para a micropropagação de *Jacarada ulei*, com base, principalmente, nos protocolos de propagação *in vitro* já definidos para outras espécies do Cerrado.

### 5.1.1. Desinfestação

A desinfestação é o processo que torna os explantes livres de contaminação antes do estabelecimento inicial da cultura (Srivastava *et al.* 2010) e consiste em imergir os explantes em soluções germicidas. É uma etapa primordial, pois um protocolo que elimine os microrganismos patogênicos dos explantes, mantendo-os vivo é indispensável para as fases seguintes da micropropagação (Grattapaglia & Machado 1998).

Diversas soluções, concentrações e períodos de imersão podem ser utilizados (Srivastava *et al.* 2010, Martins *et al.* 2011), dependendo do grau de contaminação e sensibilidade dos explantes. A utilização de explantes coletados diretamente no campo apresenta a vantagem da clonagem de matrizes selecionadas, entretanto, os tratamentos de desinfestação testados têm sido insuficientes para eliminar os organismos saprofíticos e principalmente endofíticos, comuns nestes explantes. Assim, a grande maioria dos trabalhos realizados até o momento para micropropagar plantas do Cerrado utilizou sementes como explantes iniciais (Melo *et al.* 2008).

Para a desinfestação de diásporos do Cerrado observa-se que a imersão em etanol a 70% (v/v), durante 1 a 5 minutos, seguida de hipoclorito de sódio entre 0,2 e 20% (p/v), durante 10 a 20 minutos, e 3 enxágües em água autoclavada, ou protocolos semelhantes, permitiu a obtenção de bons resultados em diversas espécies, entre elas *Gomphrena macrocephala* St. Hil. (Moreira *et al.* 2000), *Byrsonima verbascifolia* (Castro *et al.* 2005), *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Castro *et al.* 2007), *Hancornia speciosa* Gomes (Lédo *et al.* 2007)

*Alibertia edulis* Rich. (Silva *et al.* 2008) e *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. (Martins *et al.* 2011).

### **5.1.2. Fases da micropropagação**

Os sistemas de micropropagação, criado por Murashige (1974), foram adaptados na década de 80 para a micropropagação de espécies lenhosas em cinco fases: estabelecimento, multiplicação, alongamento, enraizamento e aclimatação (Deberg & Maene 1981; Riffaud & Cornu 1981; Preece *et al.* 1987).

#### **5.1.2.1. Fase de estabelecimento utilizando semente**

Após a desinfestação, os explantes são inoculados em meio nutritivo e transferidos para sala de cultivo, onde as condições são controladas. A solução nutritiva contém, geralmente, macro e micro-elementos, vitaminas, inositol e uma fonte de carbono, e é solidificada com ágar. A solução nutritiva utilizada nesta fase é geralmente utilizada nas fases seguintes. Esta etapa permite avaliar o protocolo de desinfestação utilizado e a capacidade de adaptação dos explantes às condições de cultura *in vitro* (Melo *et al.* 2008).

Quando são utilizadas sementes como explantes iniciais, a germinação é normalmente realizada em meio nutritivo sem reguladores de crescimento ou em água e ágar (Melo *et al.* 2008). As sementes apresentam vantagens do ponto de vista experimental, pois geralmente estão disponíveis em grandes quantidades, são mais facilmente descontaminadas do que as gemas coletadas em condições

naturais e não costumam liberar substâncias que oxidam o meio de cultura (Grattapaglia & Machado 1998).

Após a germinação, o desenvolvimento da parte aérea permite a obtenção de um grande número de explantes descontaminados, possibilitando a ampliação dos experimentos para estabelecer as melhores condições de multiplicação. Além disso, as condições de cultivo *in vitro* têm sido favoráveis para a condução de estudos sobre germinação (Pinheiro *et al.* 2001; Srivastava *et al.* 2011) e ontogênese da plântula e da planta jovem (Lédo *et al.* 2007; Castro *et al.* 2007; Silveira *et al.* 2012).

#### **5.1.2.2. Fase de multiplicação e subcultivos**

O objetivo da fase de multiplicação é produzir brotações morfológicamente normais (Melo *et al.* 2008). Na maioria das espécies, a presença de citocininas no meio nutritivo potencializa a formação de brotações (Thorpe 1993). De acordo com a literatura, o tipo de citocinina e sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro* (Grattapaglia & Machado 1998).

##### **5.1.2.2.1. Importância das citocininas e auxinas**

Na micropropagação de plantas do Cerrado, diversas citocininas sintéticas têm sido usadas (França *et al.* 1995; Nicioli *et al.* 2008; Silva *et al.* 2008; Oliveira *et al.* 2010; Martins *et al.* 2011), como BAP (6-benzilaminopurina), Cinetina (6-furfurilaminopurina) e 2iP (isopenteniladenina); a Zeatina [6-(4-hidróxi-3-metilbut-

2enil-amino)purina], hormônio produzido pelo milho; e o Thidiazuron (TDZ), composto derivado das feniluréias, que produz os efeitos das citocininas (Mok *et al.* 1982).

Para estimular divisão celular e o controle da morfogênese, como por exemplo, o alongamento dos brotos, o efeito das citocininas é mais perceptível quando usada com uma auxina (Staden *et al.* 2008). Neste caso, a relação auxina/citocinina deve ser pesquisada para cada espécie, mas costuma ser mantida em valores inferiores a um (Grattapaglia & Machado 1998).

A literatura indica que as concentrações de substâncias de crescimento adicionadas ao meio de cultura variam entre 0,01 e 10 mg.L<sup>-1</sup>. Espécies arbóreas, que apresentam grande dominância apical, podem necessitar de concentrações mais elevadas de citocininas para estimular a brotação, quando comparadas aos arbustos. Na multiplicação de *Stryphnodendron polyphytum* Mart. foram testados BAP, 2iP, zeatina, BAP com AIA (ácido indolacético) e BAP com AIB (ácido indolbutírico) e a maior proliferação de brotos (3,6 brotos por explante) foi observada em 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (França *et al.* 1995). Da mesma forma, em *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville a maior taxa de proliferação (3 brotos por explante) foi observada em 5 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina (Nicioli *et al.* 2008).

De maneira geral, nos tratamentos nos quais são observadas as maiores médias de multiplicação, são observadas também as menores médias de comprimento dos brotos (Melo *et al.* 2008). De fato, nas espécies citadas acima, ambas árvores do Cerrado, o maior alongamento ocorreu nas menores concentrações testadas. A obtenção de poucos brotos, porém alongados, não necessariamente reduz a multiplicação, já que cada broto pode ser excisado em dois ou mais explantes. Além disso, os brotos podem ser diretamente transferidos

para a fase de enraizamento, dispensando a fase de alongamento (Melo *et al.* 2008).

Já na multiplicação *in vitro* de arbustos nativos do Cerrado tem sido observado que a ausência ou baixas concentrações de citocininas também podem favorecer a formação de novas brotações alongadas e com folhas normalmente expandidas. Em *Macrosyphonia velame* (St. Hil.), a ausência de citocinina proporcionou a formação de 4 brotos por explante, média que não foi estatisticamente diferente dos demais tratamentos, com diferentes tipos de citocininas (Martins *et al.* 2011).

#### **5.1.2.2.2. Subcultivos**

Outro aspecto importante na fase de multiplicação é avaliar a interação dos reguladores de crescimento com os subcultivos sucessivos (Dhiraj *et al.* 2003; Sotelo & Monza 2007). Em *Alibertia edulis*, espécie arbórea do Cerrado, multiplicada em meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962), diluído a quarta parte ( $\frac{1}{4}$  MS), foi observado que BAP combinada com AIB em concentrações iguais ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) favoreceu a multiplicação e o alongamento dos brotos, nos três subcultivos sucessivos, enquanto que no meio de cultura controle, sem regulador de crescimento, embora os explantes tenham se alongado, não formaram nenhuma nova brotação (Silva *et al.* 2008). Entretanto, nos trabalhos publicados com plantas do Cerrado, de maneira geral, são apresentados apenas os dados do primeiro subcultivo.

É comum observar nos tratamentos avaliados como os melhores no primeiro subcultivo, a ocorrência, nos subcultivos seguintes, de brotos com algum

tipo de anormalidade, como por exemplo, nanismo, clorose e hiper-hidricidade ou vitrificação. Estes sintomas podem ser causados pela exposição do material a uma forte concentração de citocinina, ou de sais do meio de cultivo, ou ainda de etileno (Böttcher *et al.* 1988; Krikorian *et al.* 1983, Grattapaglia & Machado 1998; Barreto Cid & Teixeira 2010a-b). O acúmulo de etileno ocorre quando o recipiente contém grande quantidade de material vegetal e a vedação não permite as trocas de gases do interior para o exterior.

#### **5.1.2.2.3. Meio de cultura**

O meio MS (Murashige & Skoog 1962) tem sido utilizado para a grande maioria das espécies do Cerrado, propagadas *in vitro* até o momento (Castro *et al.* 2005; Nicioli *et al.* 2008). Porém, a alta concentração de sais, quando comparada a outras formulações, especialmente potássio e nitrogênio e alguns micronutrientes, como boro e manganês (Cohen 1995; Fadel *et al.* 2010), tem sido inadequada para a morfogênese de algumas espécies, em particular plantas lenhosas (Bertozzo & Machado 2010).

Diante disso, diluições nas concentrações de macro e micronutrientes de MS e soluções minerais menos concentradas, propostas por outros autores (Gamborg *et al.* 1968; Lloyd & McCown 1981; Quoirin & Lepoivre 1977), têm sido testadas e apresentado resultados satisfatórios. Como em *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. (Martins *et al.* 2011) e *Alibertia edulis* Rich (Silva *et al.* 2008), multiplicadas em solução mineral de MS diluída, respectivamente a ½ e a ¼, *Annona glabra* L. (Oliveira *et al.* 2010) e *Hancornia speciosa* Gomes (Soares *et al.*

2011) em Wood Plant Medium, WPM (Lloyd & McCown 1981) e *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don. em meio B5 (Maruyama 2003).

### 5.1.2.3. Fase de enraizamento

A indução e o alongamento de raízes adventícias, na base dos brotos, é a última etapa do processo para a obtenção de plantas inteiras a partir de explantes (Grigoletto 1997). Este processo é dependente do genótipo (Iriando *et al.* 1995; Rocha *et al.* 2008) e das condições de cultura, podendo ser realizado *in vitro* ou *ex vitro* (Grattapaglia & Machado 1998).

*In vitro*, é comum reduzir as concentrações de macro e micro nutrientes e sacarose no meio de cultura e adicionar uma auxina (Grattapaglia & Machado 1998; Melo *et al.* 2008; Souza *et al.* 2009). Segundo Pasqual *et al.* (2000), dentre os reguladores de crescimento, o AIB tem sido o mais utilizado para induzir o enraizamento de brotos. Esse regulador de crescimento promoveu melhores resultados em *Gomphrena officinalis* (Mercier *et al.* 1992) do que ANA (ácido naftalenoacético), embora o contrário tenha sido observado em *Stryphnodendron polyphytum* (França *et al.* 1995).

Resultados mais recentes, observados em um estudo anatômico de *Gomphrena officinalis* indicaram que a qualidade do sistema radicular foi superior quando o enraizamento *in vitro* ocorreu sem auxina. Nessas condições, as raízes adventícias foram similares às das plântulas e se originam diretamente do periciclo, enquanto que em meio com AIB, as raízes eram grossas e quebradiças e geralmente não se conectaram ao sistema vascular do caule, em decorrência da formação de calos na base das microestacas (Moreira *et al.* 2000).



Muitas espécies não diferenciam primórdios radiculares adventícios na presença de luz. Um ambiente escuro na base do broto pode ser obtido com a adição de carvão ativado ao meio de cultura (Pan & Staden 1998; Andrade *et al.* 2000). Com essa finalidade, geralmente são utilizadas concentrações elevadas, entre 2 e 10 g.L<sup>-1</sup> (Eymar *et al.* 2000; Kowalski & Staden 2001; Abdelwahd *et al.* 2008; Silva *et al.* 2008), embora concentrações desta ordem possam inibir enraizamento (Assis & Teixeira 1998).

O carvão também é utilizado para diminuir a incidência de compostos fenólicos, comuns em culturas de espécies lenhosas (Pan & Staden 1998; Andrade *et al.* 2000; Barrueto Cid & Teixeira 2010a), sendo, neste caso, adicionando em concentrações mais baixas, entre 0,1 e 0,3 g.L<sup>-1</sup> (Barrueto Cid & Teixeira 2010a).

*Ex vitro*, o enraizamento geralmente ocorre em casa de vegetação ou estufa, condições nas quais, via de regra, a irrigação é controlada. Já em estufa, o aprisionamento do calor (Reis 2005) mantém a temperatura e a umidade do ambiente e do solo muito mais elevadas do que na casa de vegetação, o que pode favorecer a diferenciação de primórdios radiculares.

O enraizamento *ex vitro* também apresenta a vantagem de ocorrer nas mesmas condições ambientais da fase de aclimatização, evitando a desidratação da parte aérea, desde que a adaptação dos brotos seja gradativa. Antes do plantio em substrato, a base dos brotos pode ser tratada com auxina, como é comum no enraizamento de estacas (Hartmann *et al.* 2002).

Diversos substratos podem ser testados, porém os mais utilizados para espécies do Cerrado são: vermiculita, areia lavada, substrato comercial

(Plantmax<sup>®</sup>). A vermiculita tem apresentado bons resultados para o cultivo *in vitro* (Silveira & Cottignies 1994; Preece *et al.* 1987) e *ex vitro* (Freitas-Neto 2009; Silveira *et al.* 2010). Isso ocorre provavelmente por conter elementos importantes no desenvolvimento vegetal, como o magnésio e o potássio, ter a capacidade de absorver água e de fazer trocas catiônicas, mantendo os nutrientes em reserva para a liberação tardia (Hartmann *et al.* 2002). O Plantmax<sup>®</sup>, com boa aeração e capacidade de reter água e porosidade elevada (Klein *et al.* 2000), possui teores mais elevados de nutrientes do que a vermiculita, principalmente N, encontrado na matéria orgânica, P, K e Ca + Mg (Silva *et al.* 2001). O enraizamento *ex vitro* de *Tectona grandis* apresentou bons resultados (entre 85 e 100%), tanto na vermiculita, quanto no Plantmax<sup>®</sup> (Fermino-Jr *et al.* 2011). Já o Plantmax<sup>®</sup> apresentou melhores resultados em todos os parâmetros avaliados (altura, diâmetro do caule, área foliar, peso da matéria seca de raízes e parte aérea) na produção de mudas de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deneger, em casa de vegetação (Silva *et al.* 2001), como também no enraizamento *ex vitro* de *Macrosyphonia velame* (Martins *et al.* 2011).

Ao final desta fase, o ideal é obter a formação de um sistema radicular vigoroso e sem a formação de calo entre o caule e a raiz adventícia, para que as plantas possam se desenvolver normalmente nas fases seguintes (Silveira & Cottignies 1994; Andrade *et al.* 2000, Santos *et al.* 2006).

#### **5.1.2.4. Fases de aclimatização e aclimação**

Aclimatização e aclimação são termos que denominam processos diferentes. O primeiro consiste na transferência da planta das condições *in vitro*

para um ambiente mais semelhante às condições naturais, porém ainda parcialmente controladas, como uma casa de vegetação ou estufa.

Quando o enraizamento é realizado *in vitro*, em meio gelatinoso, as raízes devem ser cuidadosamente lavadas, antes da aclimatização, a fim de eliminar os resíduos de meio, que são focos de contaminação e apodrecimento, para não comprometer a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas. No enraizamento *ex vitro*, realizado em casa de vegetação, a aclimatização costuma ser um processo continuado, sendo realizada nas mesmas condições. Já quando as plantas são enraizadas em estufa, é comum que sejam transferidas posteriormente para casa de vegetação. Em ambos os casos, após o enraizamento, as plantas devem ser transplantadas em recipientes maiores (Chinnappan *et al.* 2011) e com substrato mais adequado ao desenvolvimento. Assim muitas espécies do Cerrado tem sido aclimatizadas com mais ou menos sucesso, como *Stryphnodendron polyphytum*, 93% (França *et al.* 1995), *Alibertia edulis* 100% (Silva *et al.* 2008), *Stryphnodendron adstringens*, entre 41% e 50% (Nicioli *et al.* 2008) e *Macrosyphonia velame*, 40% (Martins *et al.* 2011).

A última fase da micropropagação é a aclimação das vitroplântulas às condições ambientais. De acordo com Melo *et al.* (2008) esta fase não apresenta dificuldades, desde que as raízes adventícias, formadas na etapa anterior, sejam alongadas e conectadas diretamente ao sistema vascular do caule dos brotos. Entretanto, trabalhos que relatem dados de sobrevivência de plantas lenhosas do Cerrado no campo são raros (Mercier *et al.* 1992). Em *Premna serratifolia*, um arbusto medicinal da Índia, após a aclimatização em casa de vegetação, as plantas foram plantadas em jardins medicinais, onde apresentaram 95% de

sobrevivência, depois de mais de um ano cultivo, e não mostraram variações na morfologia e crescimento, quando comparadas com as plantas matrizes (Chinnappan *et al.* 2011).

## OBJETIVOS

### 1. Objetivo geral

Estabelecer um protocolo de micropropagação para *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., por meio de de sementes germinadas *in vitro*.

### 2. Objetivos específicos

- Estabelecer as condições para a germinação de sementes e o desenvolvimento das plântulas *in vitro*;
- Definir as concentrações de BAP/AIB mais indicadas para multiplicação de brotos;
- Estabelecer as condições para o enraizamento dos brotos e aclimatização das plantas micropropagadas;
- Caracterizar a morfologia das plântulas e plantas jovens germinadas *in vitro*;
- Comparar a morfologia das plantas micropropagadas com: as plantas jovens, propagadas por sementes germinadas *in vitro*, e adultas, crescendo em condições naturais.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Coleta do material vegetal**

Para o estudo em questão, foram coletados frutos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. em maio e junho de 2009, a partir de cinco matrizes previamente selecionadas, crescendo em condições naturais, na Fazenda Água Limpa - FAL, da UnB (15°58'50,6"S e 47°56'58,8"W). Ramos férteis também foram coletados (23/10/2009), para a confecção de exsiccatas, depositadas sob o número de registro UB 96488, no Herbário da Universidade de Brasília (UB).

Os frutos deiscentes foram coletados ainda fechados, no final do período de maturação, quando o exocarpo mudou a coloração de verde para bege, e acondicionados em sacos de papel, os quais continham os dados de cada matriz. As sementes foram liberadas, dois ou três dias após a coleta, período em que os frutos abrem-se naturalmente, ainda dentro dos sacos de papel.

As etapas de beneficiamento das sementes e cultivo *in vitro* foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade de Brasília - UnB, DF.

### **2. Beneficiamento e desinfestação das sementes**

Após o beneficiamento manual, as sementes selecionadas foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar horizontal, por meio da imersão sucessiva em álcool 70%, durante 1 min, hipoclorito de sódio (NaOCl) comercial

(2-2,5% de cloro ativo), durante 15 min, e três enxágües em água destilada e autoclavada.

Esta etapa e as seguintes foram realizadas em condições assépticas em câmara de fluxo laminar horizontal.

### **3. Fases da micropropagação**

A micropropagação de *J. ulei* seguiu as fases definidas para espécies lenhosas: estabelecimento, multiplicação, alongamento, enraizamento e aclimação (Melo *et al.* 2008).

Os experimentos *in vitro* foram realizados em sala de crescimento nas seguintes condições: temperatura de  $27\pm 2$  °C, umidade aproximada de 80% e iluminação com lâmpadas fluorescente do tipo luz do dia com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa aproximada de  $41 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Os meios de cultura foram autoclavados a 120 °C, durante 20 min e os utensílios e substratos foram esterilizados a 150 °C, em forno Pasteur, durante pelo menos 2 h.

#### **3.1. Fase de estabelecimento: inoculação de sementes**

Após a desinfestação, as sementes das cinco matrizes foram inoculadas em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo solução de água e ágar ( $8 \text{ g.L}^{-1}$ ), homogeneizada a quente e posteriormente autoclavada.

O experimento foi inteiramente casualizado, com 80 repetições por matriz, sendo cada tubo de ensaio uma repetição. A desinfestação e a germinação foram

observadas, respectivamente no 15<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dia de cultivo. A germinabilidade foi caracterizada pelo surgimento da raiz primária e foram consideradas normais as plântulas que apresentaram sistema radicular, parte aérea e cotilédones bem desenvolvidos (MAPA 2009). A fim de comparar as características morfológicas das plantas micropropagadas com plantas produzidas por sementes, a ontogênese da plântula *in vitro* foi descrita até 120<sup>o</sup> dia de cultivo.

### **3.2. Fase de multiplicação**

Das plantas jovens produzidas na fase anterior, foram retirados explantes de caule, de cerca de 1 cm, com dois ou três nós. Os explantes com entrenós muito longos continham apenas um nó. Esses explantes foram inoculados em meio de cultura MS (Murashigue & Skoog 1962), com macro e micro elementos diluídos a quarta parte ( $\frac{1}{4}$ MS), conforme estabelecido para *J. ulmi* por Fukuda *et al.* (2009). Ao meio de cultura foi adicionado BAP (6-benzilaminopurina) e AIB (ácido 3-indol-butírico), nas concentrações 0,0; 0,01 e 0,05 mg.L<sup>-1</sup>. Os dados dessa fase foram coletados nos quatro primeiros subcultivos, formando um fatorial 2 x 3 x 4, embora tenham sido realizados sete subcultivos ao todo. No primeiro subcultivo foram realizadas 20 repetições, com quatro clones por tratamento e de 11 a 47 repetições nos subcultivos seguintes, em função da adaptabilidade e sobrevivência dos clones nos tratamentos.

Após o ajuste do pH à 5,6, foram adicionados ao meio 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar, previamente solubilizados a quente. Foram realizados sete subcultivo, de 60 dias cada, porém foram avaliados apenas os quatro primeiros e



o sétimo. O número, comprimento e o aspecto morfológico dos brotos foram avaliados ao final de cada subcultivo.

### **3.3. Fase de enraizamento**

O enraizamento de *J. ulei* foi testado em dois experimentos *in vitro* e um experimento *ex vitro*, com brotos de cerca de 2 cm, excedentes em todos os tratamentos do 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> subcultivos de multiplicação. O número de brotos provenientes de cada tratamento variou de 3 a 12 em função da multiplicação. Os brotos foram transferidos para recipientes devidamente identificados com número do clone e do subcultivo, bem como o tratamento de multiplicação. Os experimentos *in vitro* foram realizados em meio ¼MS, com pH ajustado à 5,6, 10 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 8 g.L<sup>-1</sup> de ágar.

Os dados referentes ao enraizamento foram coletados após 90 dias de cultivo em *in vitro* ou após a transferência dos brotos para a estufa. Foram observados: a sobrevivência das plantas, as características morfológicas da parte aérea (aspecto e vigor) de alguns clones, o número de plantas enraizadas e as características do sistema radicular. Para avaliar o desenvolvimento do sistema radicular foram observados: o número raízes adventícias por planta, comprimento da maior raiz por planta, número de plantas com raízes laterais, número de plantas com raízes maiores do que 1 cm e comprimento da maior raiz acima de 1 cm (Nicioli *et al.* 2008).

### **3.3.1. Experimento 1 – *in vitro***

Neste experimento dois a três brotos de cada tratamento de multiplicação (BAP/AIB), selecionados pelo vigor, foram inoculados em 24 tubos de ensaio, com 7 g.L<sup>-1</sup> carvão ativado (Marca Sigma Aldrich). O controle foi realizado sem a adição de carvão. Foram realizadas 24 repetições por tratamento.

### **3.3.2. Experimento 2 – *in vitro***

Semelhante ao experimento 1, dois a três brotos de cada tratamento de multiplicação foram inoculados em meio com AIB a 0; 0,01; 0,05 mg.L<sup>-1</sup> e 7 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Foram realizadas 24 repetições por tratamento.

### **3.3.3. Experimento 3 – *ex vitro***

Este experimento objetivou avaliar o enraizamento das brotações provenientes de todos os tratamentos de multiplicação e, concomitantemente, aclimatizá-los em estufa. Os brotos (n=52) foram transferidos para garrafas PET (cerca de 2 L), transparentes, cortadas com cerca de 25 cm de altura, perfuradas em suas bases e preenchidas com três partes de latossolo vermelho (coletado nos primeiros 30 cm da camada superficial do solo) e uma parte, até a borda, de vermiculita média (Brasil Minérios) autoclavada. Estes recipientes, contendo de 1 a 4 brotos, foram transferidos, em maio de 2009 (período de seca), para estufa, sem climatização automática, com temperatura de aproximadamente 40 °C,

umidade relativa 95%, intensidade luminosa  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e sistema de irrigação automática.

No 8<sup>o</sup> e no 40<sup>o</sup> dia após a transferência, os recipientes foram irrigados com 50 ml de  $\frac{1}{4}$  MS (Chinnappan *et al.* 2011), sem adição de reguladores de crescimento, previamente autoclavado.

#### **3.3.4. Enraizamento durante a fase de multiplicação *in vitro***

A formação de raízes durante a fase de multiplicação foi observada em todos os tratamentos com BAP/AIB, aos 90 dias do 6<sup>o</sup> subcultivo. Os parâmetros utilizados para avaliar o enraizamento foram os mesmo citados acima (cf. 2<sup>o</sup> §; 3.3. Fase de enraizamento).

#### **4. Aclimatização**

As plantas enraizadas foram aclimatizadas, em julho de 2009 (período de seca), em estufa e posteriormente em casa de vegetação.

Nesta fase, afim de não comprometer a sobrevivência e possibilitar a avaliação do desenvolvimento a longo prazo, as plantas não foram desenterradas para análise quantitativa do sistema radicular. Porém, foi realizada uma descrição morfológica da parte aérea e do sistema radicular de 3 plantas desenvolvidas em condição de estufa e de casa de vegetação.

## **4.1. Aclimatização em estufa**

### **4.1.1. Plantas enraizadas *ex vitro***

Após 120 dias de cultivo em estufa, seis plantas foram transferidas para viveiro, enquanto as demais (n=41) permaneceram na estufa; a sobrevivência das plantas nas duas condições foi avaliada, respectivamente, após 3 e 18 meses.

### **4.1.2. Plantas enraizadas durante a fase de multiplicação**

Plantas enraizadas durante a fase de multiplicação (n=11) foram aclimatizadas em estufa nas mesmas condições anteriormente citadas, sendo apenas uma planta por garrafa PET. A sobrevivência das plantas foi observada no 18<sup>o</sup> mês.

## **4.2. Casa de vegetação**

No 21<sup>o</sup> mês de cultivo em estufa sete plantas foram transplantadas para recipientes de cultivo de polipropileno (dimensões: 40 cm x 20 cm e volume: 7 L), contendo latossolo vermelho. Posteriormente permaneceram por mais 10 dias na estufa e foram transferidas para casa de vegetação. O desenvolvimento das plantas está sendo acompanhado e os dados apresentados nesse trabalho foram coletados no 24<sup>o</sup> mês de cultivo.

## **5. Análise anatômica**

A fim de analisar a anatomia da conexão do sistema radicular com a parte aérea das plantas enraizadas *ex vitro* (Moreira *et al.* 2000), amostras de cerca de 5 mm da base dos brotos com raízes adventícias (90 dias após a transferência dos brotos para a estufa) foram preparadas e fixadas em álcool 70%. Posteriormente foram seccionadas a 10 µm, com auxílio de micrótomo de bancada e lâmina de corte histológico. Os cortes foram clarificados em solução de hipoclorito de sódio 0,25% durante 15 min, corados com vermelho neutro ou com lugol, para a detecção de amido (Johansen 1940), e montados em gelatina glicerinada.

## **6. Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância (Anova) utilizando o programa computacional SISVAR versão 5.1, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância (Ferreira 2008).

## RESULTADOS

### 1. Desinfestação, germinação e desenvolvimento da planta

No 15<sup>o</sup> dia de cultivo, as sementes inoculadas *in vitro* apresentaram acima de 95% de desinfestação nas cinco matrizes testadas. O tratamento efetuado nas sementes para iniciar a germinação asséptica de *J. ulei* não afetou a germinabilidade a qual, no 30<sup>o</sup> dia, foi elevada, entre 90 e 100%, nas sementes coletadas de todas as matrizes e, com exceção da matriz 3, com 75% de sementes germinadas, não diferiram estatisticamente (Tabela 3). No 60<sup>o</sup> dia, as porcentagens de plantas com características morfológicas normais também foram elevadas em todas as matrizes, acima de 90%, e não apresentaram diferença estatística (Tabela 3).

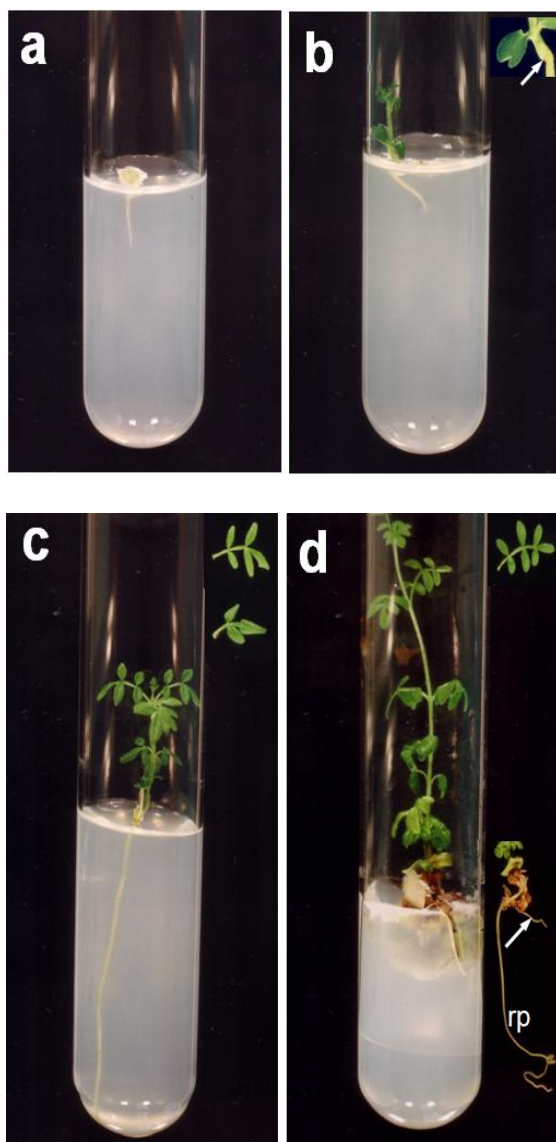
**Tabela 3.** Germinabilidade (%) no 30<sup>o</sup> dia de cultura e plantas normais (%) no 60<sup>o</sup> dia de cultura, em diferentes matrizes de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum.

Identificação da Matriz	Sementes germinadas (%)	Plantas normais (%)
1	98,8 (80) <b>a</b>	92,4 (79) <b>a</b>
2	100 (80) <b>a</b>	93,7 (80) <b>a</b>
3	75,0 (80) <b>b</b>	91,7 (60) <b>a</b>
4	90,0 (80) <b>a</b>	90,3 (72) <b>a</b>
5	96,2 (80) <b>a</b>	92,2 (77) <b>a</b>

Valores seguidos da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). (n)=número de repetições.

A germinação e o desenvolvimento normais da plântula e da planta jovem são apresentados nas Figuras 3 e 4a. A germinação inicia com a expansão da raiz primária entre o 10<sup>o</sup> e o 12<sup>o</sup> dia de cultura (Figura 3a). A parte aérea começa a se desenvolver a partir do 15<sup>o</sup> dia após a inoculação. No 20<sup>o</sup> dia, observa-se

que a plântula possui cotilédones foliáceos, de formato cordiforme e a região do coleto posicionada obliquamente (Figura 3b, detalhe). No 30º dia a plântula apresenta folhas compostas e filotaxia oposta desde o primeiro par (Figura 3c).



**Figura 3.** Germinação, desenvolvimento da plântula e planta jovem de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), durante a fase de estabelecimento, em solução de água e ágar (8%). a. Germinação no 12º dia de cultivo. b. Parte aérea apresentando cotilédones foliáceos, com formato cordiforme, e região do coleto oblíqua (detalhe; seta no coleto), no 20º dia de cultivo. c. Expansão dos primeiros eófilos, compostos de 3 e 5 folíolos (detalhe), no 60º dia de cultivo, quando são retirados os explantes para a fase seguinte. d. Alongamento dos entrenós superiores e expansão dos eófilos com 7 folíolos (detalhe superior). Detalhe do desenvolvimento do sistema radicular, com a raiz primária (rp) e uma única raiz lateral (seta), no 120º dia de cultivo.

O primeiro e o segundo pares de eofilos possuem três folíolos. O terceiro par de eofilos (raramente o segundo) e todas as folhas formadas até o 60<sup>o</sup> dia de cultivo possuem cinco folíolos, quando a plântula tem entre quatro e seis pares de folhas ao todo (Figura 3c). Do 60<sup>o</sup> até o 120<sup>o</sup> dia, observa-se o aumento do número de folíolos para sete (Figura 3d).

Embora as porcentagens de plântulas com características morfológicas normais (Figura 4a) tenham sido elevadas e sem diferença estatística (Tabela 3), a formação de plântulas anormais foi verificada a partir de sementes de todas as matrizes testadas. As anormalidades apresentadas estão relacionadas principalmente com a má formação do sistema radicular (Figuras 4b-c), que comumente possui a região apical da raiz primária necrosada (Figura 4c). Porém, as partes aéreas dessas plantas apresentaram desenvolvimento normal, quando usadas como explantes na fase seguinte.

A germinação de sementes do mesmo lote, armazenadas em sacos de papel à temperatura ambiente, apresentou diminuição da germinabilidade. Assim sementes armazenadas por seis e doze meses apresentaram porcentagens de germinação respectivamente de 47,9% e 29,2% que não diferiram estatisticamente (Tabela 4).

**Tabela 4.** Germinabilidade (%) de sementes *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., armazenadas por 6 meses e 12 meses, avaliada no 30<sup>o</sup> dia de cultura.

Período de armazenamento (meses)	Sementes germinadas (%)
6	47,9 <b>a</b>
12	29,2 <b>a</b>

Valores seguidos da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste

Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). n=48 sementes.





**Figura 4.** Desenvolvimento da plântula de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), durante a fase de estabelecimento, em solução de água e ágar (8%), no 20<sup>o</sup> dia de cultivo. a. Plântula normal, com raiz primária alongada. b-c. Plântulas anormais, com raiz primária pouco desenvolvida ou com a região apical necrosada. Observe que a parte aérea apresenta desenvolvimento normal. Barra = 0,5 cm.

## 2. Multiplicação e subcultivos

Da parte aérea das plantas com 60 dias de cultura, produzidas na fase anterior, foram retirados e repicados explantes de caule para meio de multiplicação. As tabelas 5 e 6 apresentam as médias ( $\pm$  erro padrão) do número e comprimento dos brotos formados nos diferentes tratamentos, nos quatro subcultivos sucessivos.

A análise de variância revelou que o número de brotos produzidos por explante foi significativamente influenciado pelos subcultivos e pelas interações das concentrações de BAP com AIB e BAP com os subcultivos. As médias do número de brotos por explante não apresentaram grandes variações nos diferentes tratamentos, nos quatro subcultivos, ficando, de maneira geral, entre 1 e 2 (Tabela 5). Isso indica que todos os tratamentos, inclusive o controle, favorecem a brotação. No 1<sup>o</sup> subcultivo as médias dos números de brotos não foram significativamente diferentes. Nos demais subcultivos, alguns tratamentos

se destacaram, como no 2<sup>o</sup> subcultivo, na ausência de BAP nas três concentrações de AIB ou em 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, respectivamente 2,2, 2,8, 3,0 e 2,4 (Tabela 5). No 4<sup>o</sup> subcultivo, as médias de todos os tratamentos diminuíram, porém, de maneira geral, não diferiram do 3<sup>o</sup> subcultivo, exceto em meio com 0,05 mg.L<sup>-1</sup> BAP combinado com AIB 0,01 ou 0,05 mg.L<sup>-1</sup>. É importante destacar que no controle, sem reguladores de crescimento, os resultados foram semelhantes ao da maioria dos tratamentos com BAP e/ou AIB.

**Tabela 5.** Número de brotos em *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. cultivada em meio de cultura contendo BAP (6-benzilaminopurina) e AIB (ácido 3-indol-butírico), em diferentes concentrações, totalizando nove tratamentos, em quatro subcultivos sucessivos de 60 dias cada. Média ± erro padrão.

Trat.	BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	AIB (mg.L <sup>-1</sup> )	Subcultivos			
			1	2	3	4
1	0,00	0,00	1,8±0,3 <b>aA</b>	2,2±0,5 <b>aA</b>	1,7±0,2 <b>aA</b>	1,3±0,1 <b>bA</b>
2	0,00	0,01	1,7±0,2 <b>aA</b>	2,8±0,4 <b>aB</b>	1,8±0,2 <b>aA</b>	1,7±0,2 <b>aA</b>
3	0,00	0,05	1,9±0,2 <b>aA</b>	3,0±0,6 <b>aB</b>	1,4±0,1 <b>bA</b>	1,6±0,1 <b>aA</b>
4	0,01	0,00	1,4±0,2 <b>aA</b>	2,1±0,2 <b>bA</b>	1,8±0,1 <b>aA</b>	1,7±0,1 <b>aA</b>
5	0,01	0,01	1,9±0,3 <b>aA</b>	1,9±0,2 <b>bA</b>	1,6±0,1 <b>aA</b>	1,4±0,1 <b>aA</b>
6	0,01	0,05	1,7±0,3 <b>aA</b>	1,8±0,2 <b>bA</b>	1,3±0,1 <b>bA</b>	1,5±0,2 <b>aA</b>
7	0,05	0,00	1,8±0,2 <b>aA</b>	2,4±0,2 <b>aB</b>	1,8±0,2 <b>aA</b>	1,2±0,1 <b>bA</b>
8	0,05	0,01	1,0±0,0 <b>aA</b>	1,5±0,4 <b>bA</b>	2,0±0,2 <b>aB</b>	1,0±0,0 <b>bA</b>
9	0,05	0,05	2,1±0,3 <b>aB</b>	1,1±0,1 <b>bA</b>	2,0±0,2 <b>aB</b>	1,5±0,1 <b>aA</b>

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott Knott (p<0,05). n=11 a 47.

Pela análise de variância verificou-se que as concentrações de BAP, AIB e os subcultivos influenciaram significativamente o comprimento dos brotos de *J. ulmi*, da mesma forma que todas as interações entre estes fatores, exceto BAP com subcultivo.

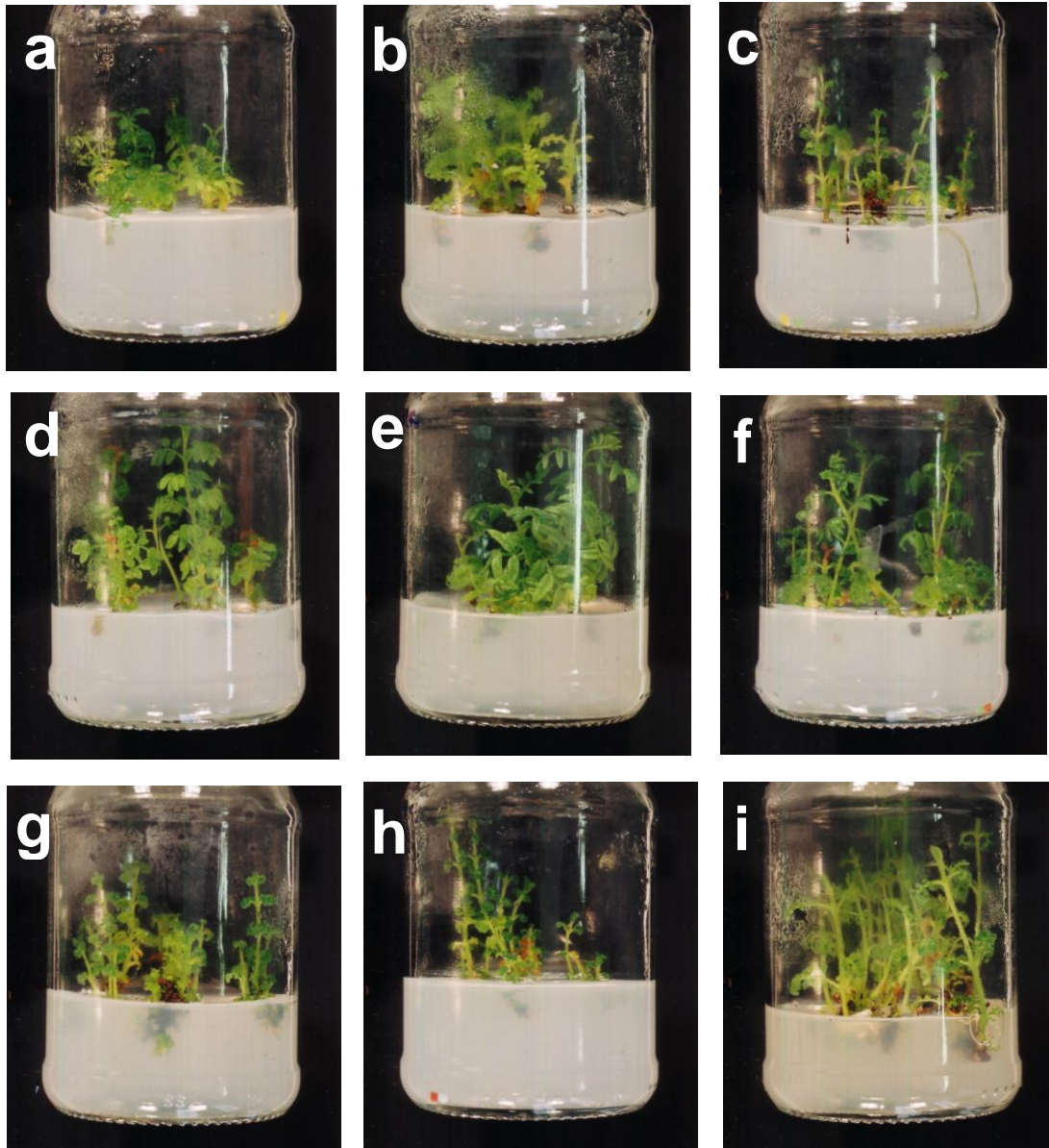
De maneira geral, as médias dos comprimentos dos brotos variaram entre 1 e 2 cm (Tabela 6). No 1º subcultivo, o comprimento médio não diferiu estatisticamente na maioria dos tratamentos, exceto em 0,01 mg.L<sup>-1</sup> e 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de BAP sem AIB e 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de BAP com a mesma concentração de AIB, que foram significativamente superiores aos demais tratamentos. No 2º subcultivo, com exceção do tratamento 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de BAP na ausência de AIB, as médias de comprimento observadas em cada tratamento aumentaram nos subcultivos sucessivos até o 3º subcultivo. A média de comprimento ( $\pm$  erro padrão) em todos os tratamentos, nos três primeiros subcultivos foram respectivamente 1,2  $\pm$  0,1 cm (n=229), 1,6  $\pm$  0,1 cm (n=215) e 2,2  $\pm$  0,1 cm (n=271). No 4º subcultivo todas as médias diminuíram, ficando a média geral neste subcultivo 1,6  $\pm$  0,1 cm (n=186), mas na maioria dos tratamentos se mantiveram acima das médias observadas no 1º subcultivo. As maiores médias de comprimento foram observadas no 3º e 4º subcultivos, nas concentrações mais elevadas de BAP e AIB, respectivamente 3,5 e 2,7 cm. Da mesma forma que na média do número de brotos, o comprimento médio do controle também teve resultados semelhantes aos demais tratamentos sem reguladores de crescimento.

**Tabela 6.** Comprimento dos brotos em *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. cultivada em meio de cultura contendo BAP (6-benzilaminopurina) e AIB (ácido3-indol-butírico), em diferentes concentrações, totalizando nove tratamentos, em quatro subcultivos sucessivos de 60 dias cada. Média ± erro padrão.

Trat.	BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	AIB (mg.L <sup>-1</sup> )	Subcultivos			
			1	2	3	4
1	0,00	0,00	1,1±0,1 <b>bB</b>	1,3±0,2 <b>bB</b>	1,9±0,1 <b>bA</b>	0,9±0,1 <b>cB</b>
2	0,00	0,01	1,1±0,1 <b>bB</b>	1,9±0,2 <b>aA</b>	1,9±0,1 <b>bA</b>	1,6±0,1 <b>bB</b>
3	0,00	0,05	1,0±0,1 <b>bC</b>	1,7±0,2 <b>aB</b>	2,1±0,2 <b>bA</b>	1,7±0,1 <b>bB</b>
4	0,01	0,00	1,5±0,3 <b>aA</b>	1,7±0,1 <b>aA</b>	2,2±0,1 <b>bA</b>	1,8±0,2 <b>bA</b>
5	0,01	0,01	1,0±0,1 <b>bB</b>	1,7±0,1 <b>aA</b>	2,1±0,1 <b>bA</b>	0,8±0,1 <b>cB</b>
6	0,01	0,05	1,0±0,3 <b>bC</b>	1,5±0,1 <b>aB</b>	2,0±0,1 <b>bA</b>	1,6±0,2 <b>bB</b>
7	0,05	0,00	1,8±0,3 <b>aA</b>	1,3±0,1 <b>bB</b>	2,3±0,2 <b>bA</b>	1,0±0,2 <b>cB</b>
8	0,05	0,01	0,9±0,2 <b>bB</b>	1,9±0,1 <b>aA</b>	2,1±0,2 <b>bA</b>	1,7±0,1 <b>bA</b>
9	0,05	0,05	1,3±0,2 <b>aC</b>	1,6±0,2 <b>aC</b>	3,5±0,3 <b>aA</b>	2,7±0,2 <b>aB</b>

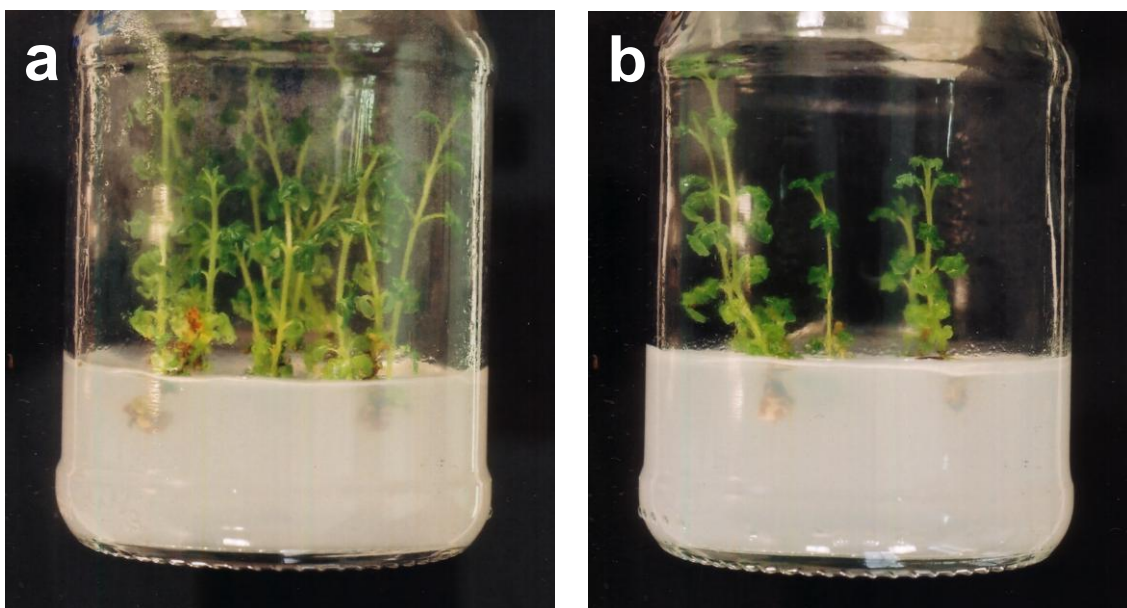
Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ( $p < 0,05$ ). n=11 a 47.

A Figura 5 apresenta o aspecto morfológico dos brotos multiplicados nos nove tratamentos testados, ao final da 4<sup>o</sup> subcultivo. A formação de brotos ocorreu em todos os tratamentos e que, maneira geral, os maiores alongamentos ocorreram nas concentrações mais elevadas de AIB, as quais, entretanto apresentaram folíolos menos expandidos e com sinais de vitrificação. Embora não

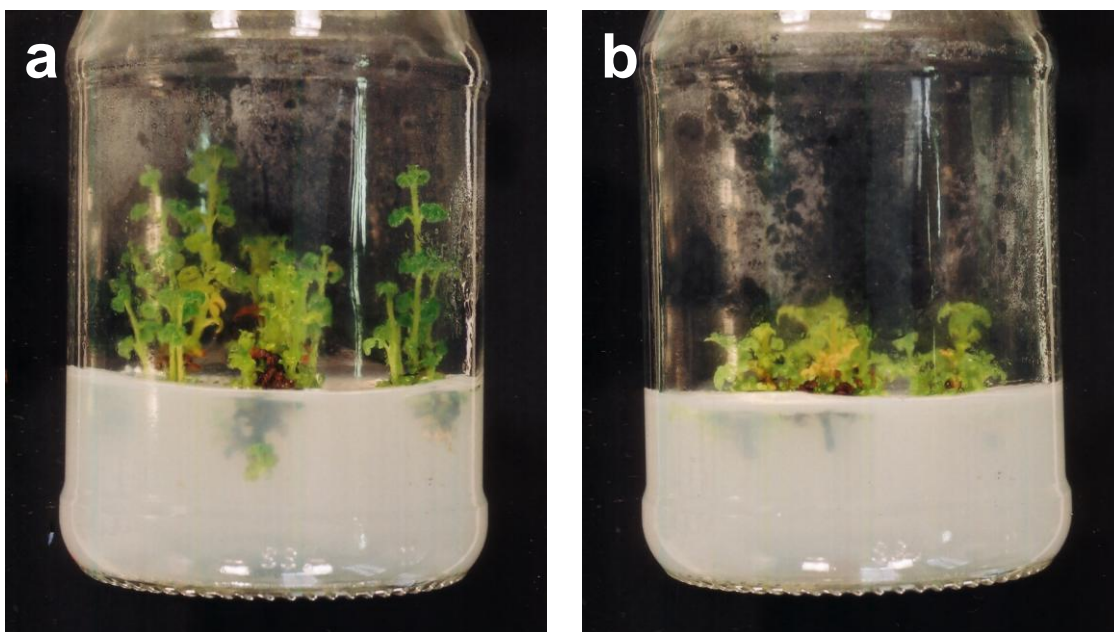


**Figura 5.** Aspecto dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), durante a fase de multiplicação, cultivados em  $\frac{1}{4}$  MS com BAP/AIB (0,00; 0,01, 0,05 mg.L<sup>-1</sup>), no 60<sup>o</sup> dia de cultivo da 4<sup>o</sup> subcultivo. a. 0,00/0,00. b. 0,00/0,01. c. 0,00/0,05. d. 0,01/0,00. e. 0,01/0,01. f. 0,01/0,05. g. 0,05/0,00. h. 0,05/0,01. i. 0,05/0,05.

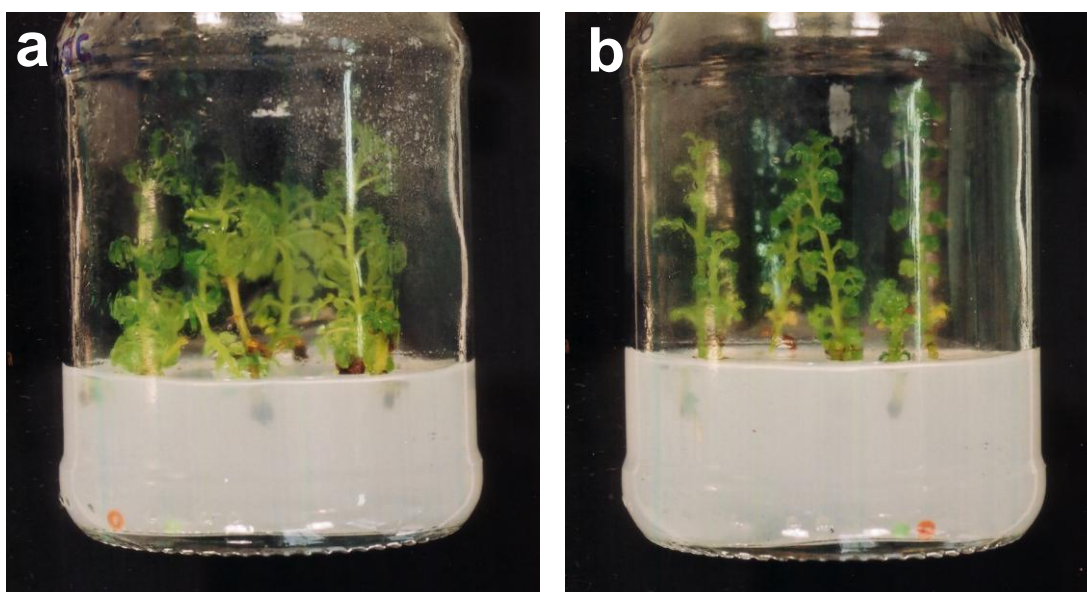
quantificado, foi observado também que, durante um mesmo subcultivo e em um mesmo tratamento, os clones podem responder muito diferentemente, tanto na multiplicação (Figura 6), quanto no alongamento (Figura 7). Assim, como apresentado, respectivamente nas Figuras 6 e 7, o clone 12 se multiplica mais do que o 8 e o clone 6 se alonga mais do que 18, demonstrando diferença na resposta dos clones aos tratamentos. Da mesma maneira, o comportamento de um mesmo clone pode variar muito, tanto em subcultivos diferentes, quanto em um mesmo subcultivo, como indica a Figura 8, na qual o clone 11 apresenta novas brotações em um dos recipientes de cultivo e apenas alongamento dos explantes em outro recipiente, ambos no durante o 4<sup>o</sup> subcultivo.



**Figura 6.** Aspecto morfológico dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), durante a fase de multiplicação, cultivados em  $\frac{1}{4}$  MS com BAP/AIB 0,05/0,05 mg.L<sup>-1</sup>, no 60<sup>o</sup> dia do 4<sup>o</sup> subcultivo. a. Clone 12. b. Clone 8. Observe que quantidade de brotos por explante é muito maior no clone 12, embora o comprimento dos brotos sejam equivalentes nos dois clones.



**Figura 7.** Aspecto morfológico dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), durante a fase de multiplicação, cultivados em  $\frac{1}{4}$  MS com BAP/AIB 0,05/0,00 mg.L<sup>-1</sup>, no 60<sup>o</sup> dia do 4<sup>o</sup> subcultivo. a. Clone 6. b. Clone 18. Observe que o comprimento dos brotos é muito maior no clone 6, embora a quantidade de brotos por explante seja equivalente nos dois clones.



**Figura 8.** Aspecto morfológico dos brotos do clone 11 de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), durante a fase de multiplicação, cultivados em  $\frac{1}{4}$  MS com BAP/AIB 0,01/0,05 mg.L<sup>-1</sup>, no 60<sup>o</sup> dia do 4<sup>o</sup> subcultivo. Observe o maior número de brotações por explante e folíolos mais expandidos em a do que em b, embora seja o mesmo clone, cultivados no mesmo tratamento.

### 3. Enraizamento

O enraizamento de *J. ulei* foi testado em dois experimentos *in vitro* e um experimento *ex vitro*.

#### 3.1. Experimento 1 – *in vitro*

No meio com carvão não ocorreu enraizamento (Tabela 7), embora um pequeno calo cicatricial tenha se formado na base dos brotos (Figura 9a). A parte aérea dos brotos se desenvolveu até o 45<sup>o</sup> dia de cultivo (Figura 9a), porém não houve formação de novas brotações (Tabela 8). Posteriormente a parte superior dos ramos começou a necrosar e as folhas da parte inferior ficaram cloróticas. No 90<sup>o</sup> dia de cultivo, embora a sobrevivência tenha sido de 100% (Tabela 8), todos os explantes apresentavam as características citadas acima (Figura 9b).

No meio controle, sem carvão, 67% dos brotos enraizaram e apresentaram, em média, 2,9 raízes adventícias, com a maior raiz medindo cerca de 2 cm de comprimento (Tabela 7). Entretanto, menos da metade dos brotos apresentou raízes com alongamento acima de 1 cm (Figuras 9 c-d), isso é, de maneira geral, as raízes formadas eram curtas e apresentavam ápice necrosado (Figura 9e), indicando uma interrupção no desenvolvimento. Além disso, as raízes adventícias não diferenciaram de raízes laterais (Figuras 9c-e). Como no tratamento com carvão, no 90<sup>o</sup> dia de cultivo, a sobrevivência foi de 100% e a parte aérea dos brotos também sofreu necrose, porém o desenvolvimento foi assegurado pela formação de novas brotações, observada em 75% dos explantes (Tabela 8).



**Tabela 7.** Enraizamento (%) e desenvolvimento do sistema radicular em brotos em *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. cultivada em meio ¼ MS com ou sem carvão ativado, no 90<sup>o</sup> dia de cultivo. Média ± erro padrão.

Meio	Enraizamento (%)	Número de raízes	Comprimento da maior raiz (cm)	Brotos com raízes laterais (%)	Brotos com raízes ≥ 1 cm	
					%	Comprimento da maior raiz (cm)
Com Carvão	0 <b>b</b> (24)	0	-	-	-	-
Sem Carvão	67 <b>a</b> (24)	2,9 ± 0,5 (16)	2,1 ± 0,4 (16)	0 (16)	44 (16)	3,8 ± 0,5 (7)

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott (p<0,05).

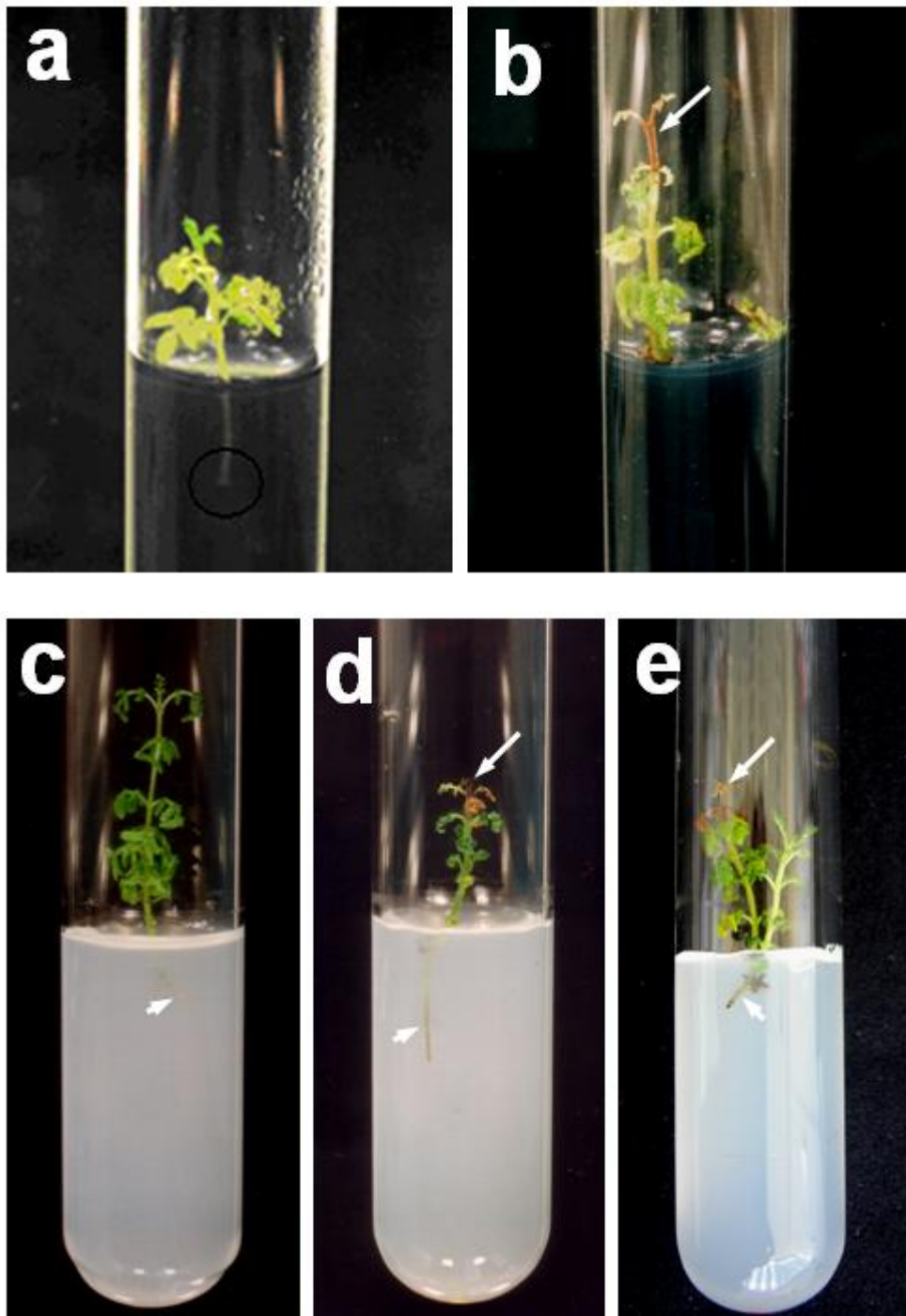
(n)=número de repetições.

**Tabela 8.** Sobrevivência (%) e características da parte aérea dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., durante o enraizamento, em meio ¼ MS com ou sem carvão ativado, no 90<sup>o</sup> dia de cultivo.

Meio	Sobrevivência (%)	Necrose do ápice (%)	Nova brotação (%)
Com Carvão	100	100 <b>a</b>	0 <b>b</b>
Sem Carvão	100	71 <b>b</b>	75 <b>a</b>

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott

(p<0,05). n=24.



**Figura 9.** Desenvolvimento dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), durante a fase de enraizamento, em meio  $\frac{1}{4}$  MS. a-b. Brotos não enraizados em meio com carvão. Observe calo cicatricial na base do ramo (a, círculo preto). c-e. Brotos enraizados (setas curtas) em meio sem carvão. Observe e os ápices caulinares vivos, no 30<sup>o</sup> dia (a e c) e necrosados (setas longas), no 90<sup>o</sup> dia de cultivo (b,d-e).

### **3.2. Experimento 2 – *in vitro***

O enraizamento em meio com carvão ativado adicionado de AIB nas concentrações de 0,01 e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> foi testado. Os resultados foram semelhantes aos observados em meio com carvão e sem AIB, no experimento anterior, isso é, no 90<sup>o</sup> dia de cultivo todos os brotos sobreviveram, porém não enraizaram.

### **3.3. Experimento 3 - *ex vitro***

O objetivo deste experimento foi avaliar o enraizamento dos brotos e, concomitantemente, aclimatizá-los em estufa. Nestas condições, no 90<sup>o</sup> dia de cultivo, 79% dos brotos enraizaram e apresentaram aproximadamente 2 raízes adventícias por broto, com a maior raiz medindo 4,6 cm de comprimento, em média (Tabela 9). Em estufa, 90% dos brotos apresentou raízes alongadas, com 5 cm de comprimento em média e, 34% dos brotos apresentaram raízes laterais. As Figuras 10 a-b ilustram o desenvolvimento das plantas enraizadas, mostrando parte aérea com entrenós alongados e folhas compostas imparipinadas, as quais aumentam o número de folíolos da base para o ápice do caule (3, 5 e 7 folíolos) e não possuem sintomas de deficiência nutricional.

A análise anatômica da base do caule (Figuras 11 a-d), na região onde a raiz adventícia emerge, confirma que a vascularização da raiz está conectada com a do caule (Figuras 11 c-d). Além disso, a reação com lugol nesta região indica que o amido existente (Figura 11b) é hidrolisado durante a diferenciação da raiz (Figura 11d).

Como no experimento 1, no 90<sup>o</sup> dia de cultivo, a sobrevivência da parte aérea foi elevada (98%), entretanto, como não ocorreu necrose dos ápices, os quais continuaram a se desenvolver (Figuras 10 a-b), apenas 6% dos brotos apresentaram novas brotações (Tabela 10). Além disso, os sintomas de vitrificação da parte aérea, observados durante a fase de multiplicação, desapareceram e os folíolos passaram a se expandir normalmente (Figuras 10 a-b).

**Tabela 9.** Enraizamento (%) e desenvolvimento do sistema radicular em brotos em *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. em vermiculita, sob condições de estufa, no 90<sup>o</sup> dia de cultivo. Média  $\pm$  erro padrão.

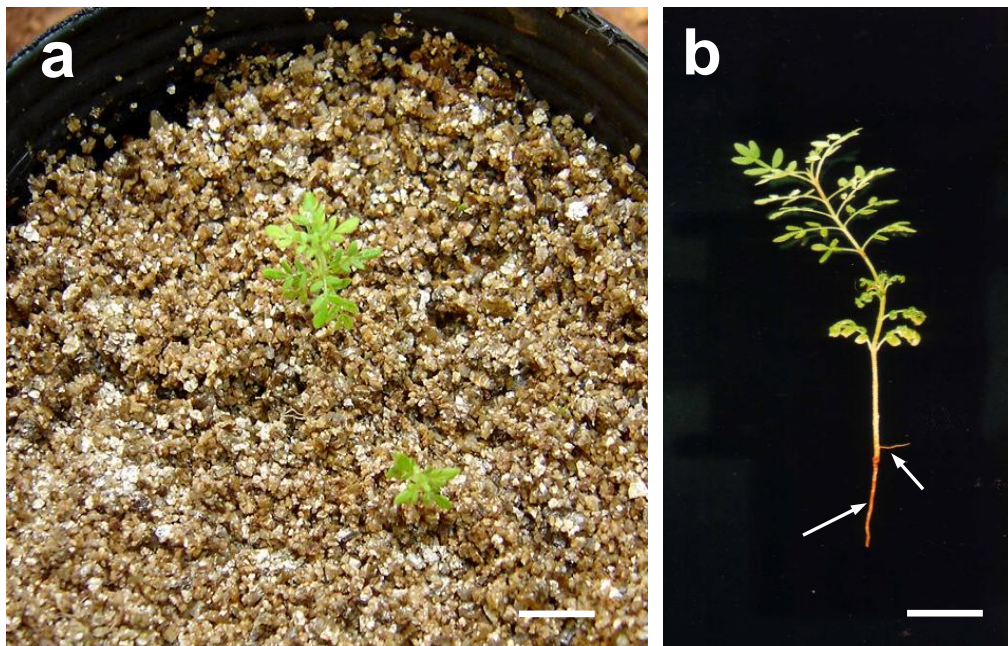
Enraizamento (%)	Número de raízes	Comprimento da maior raiz (cm)	Brotos com raízes laterais (%)	Brotos com raízes $\geq$ 1 cm %	Comprimento da maior raiz (cm)
79	2,1 $\pm$ 0,2	4,6 $\pm$ 0,5	34	90	5,0 $\pm$ 0,6
(52)	(41)	(41)	(41)	(41)	(37)

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ( $p < 0,05$ ). (n)=número de repetições.

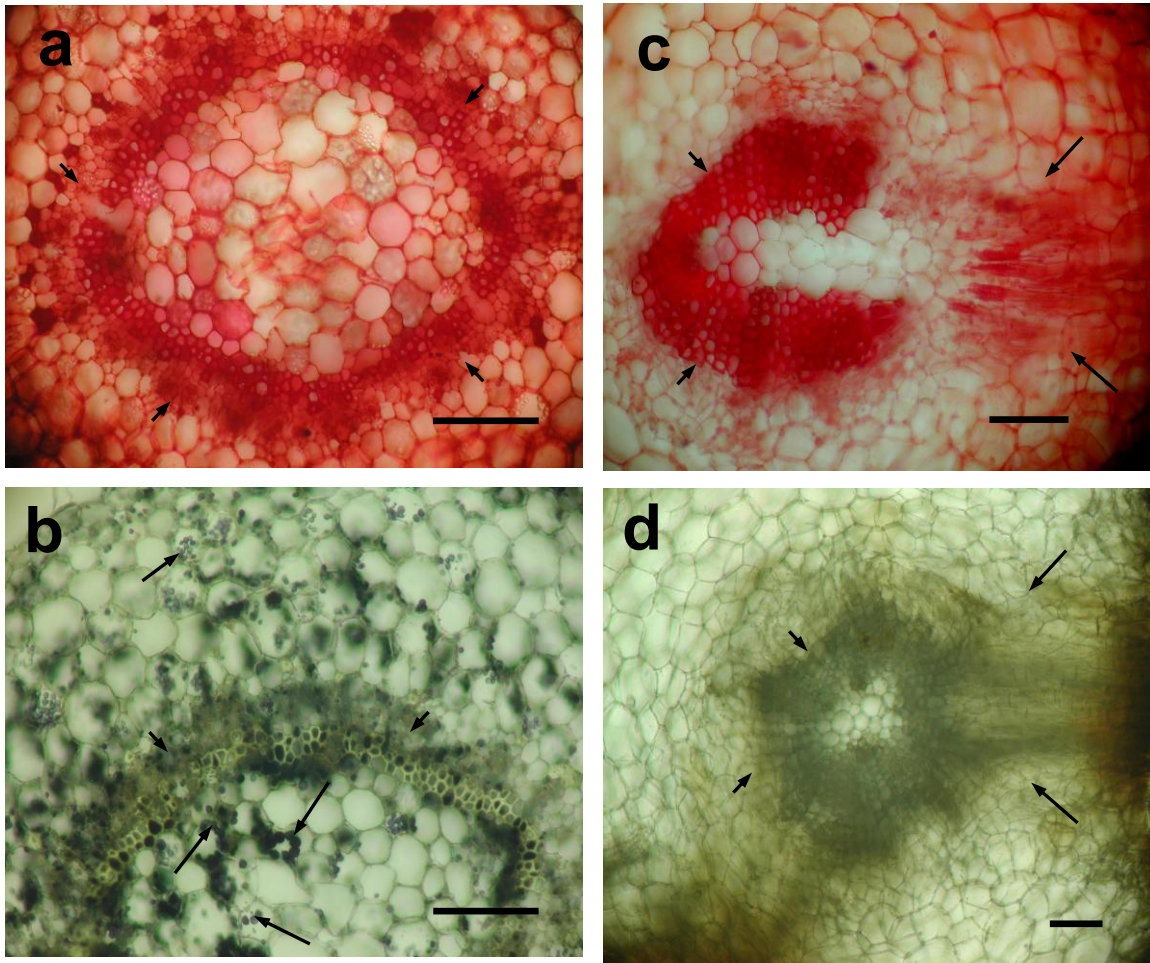
**Tabela 10.** Sobrevivência (%) e características da parte aérea dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., durante o enraizamento em vermiculita, sob condições de estufa, no 90<sup>o</sup> dia de cultivo.

Sobrevivência (%)	Necrose do ápice (%)	Nova brotação (%)
98	0	6
(52)	(51)	(51)

(n)=número de repetições



**Figura 10.** Plantas de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), multiplicados *in vitro*, durante a fase de enraizamento *ex vitro*, em estufa, após 90 dias de cultivo em vermiculita. a. Aspecto geral das plantas, apresentado o vigor da parte aérea. b. Detalhe do sistema radicular com duas raízes adventícias (setas). Barra = 1 cm.



**Figura 11.** Estudo anatômico de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae), apresentado a região cambial (setas curtas), durante a fase de enraizamento *ex vitro*, em estufa, após 90 dias de cultivo em vermiculita. a-b. Antes do enraizamento. c-d. Após o enraizamento. b e d. Após reação com lugol, respectivamente com (setas longas) e sem amido. c e d. Apresentado raiz adventícia (setas longas). Barra = 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.4. Enraizamento durante a fase de multiplicação *in vitro*

Considerando a formação de raízes durante a fase de multiplicação, o enraizamento foi observado, com o intuito de verificar a necessidade de uma fase específica para este fim. Assim, o enraizamento foi avaliado em todos os tratamentos com BAP/AIB, no 90<sup>o</sup> dia do 6<sup>o</sup> subcultivo.

As maiores porcentagens de enraizamento ocorreram na ausência de reguladores de crescimento ou nas combinações BAP/AIB 0,00/0,01 e 0,01/0,01 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente 48%, 63% e 36%, as quais diferiram significativamente dos demais tratamentos. Nessas condições, ocorreu a formação de 2 ou 3 raízes adventícias por broto, com a maior raiz medindo cerca de 1 cm de comprimento, (Tabela 11); entretanto, as porcentagens de brotos que apresentaram raízes alongadas, maiores que 1 cm não ultrapassou 40% (Tabela 11). Nos tratamentos com a concentração mais elevada (0,05 mg.L<sup>-1</sup>) tanto de BAP, quanto de AIB, a porcentagem de enraizamento não ultrapassou 25%. A diferenciação de raízes laterais não ocorreu em nenhum dos tratamentos.

Como nos experimentos de enraizamento, no 90<sup>o</sup> dia de cultivo, a sobrevivência da parte aérea (Tabela 12) foi elevada em todos os tratamentos (acima de 93%). Embora, de maneira geral as brotações permanecessem vigorosas após 3 meses de cultivo, a ocorrência de necrose dos ápices ocorreu em todos os tratamentos, variando entre 5% e 50% (Tabela 12). Considerando que os tratamentos já tinham a função de induzir a formação de brotação, este parâmetro não foi avaliado, como nos experimentos de enraizamento. A figura 5c ilustra o enraizamento durante a fase de multiplicação.

**Tabela 11.** Enraizamento (%) e desenvolvimento do sistema radicular em *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. durante a fase de multiplicação *in vitro*, em todos os tratamentos com BAP/AIB, no 90º dia do 6º subcultivo. Média ± erro padrão.

Tratamento BAP AIB (mg.L <sup>-1</sup> )		Enraizamento (%)	Númerode raízes	Comprimento da maior raiz (cm)	Brotos com raízes laterais (%)	Brotos com raízes ≥ 1 cm %	Comprimento da maior raiz (cm)	
0,00	0,00	48 (31)	<b>b</b>	2,2 ± 0,4 (15)	1,3 ± 0,5 (15)	0 (15)	40 (15)	2,5 ± 1,2 (15)
0,00	0,01	63 (30)	<b>a</b>	2,4 ± 0,3 (19)	1,2 ± 0,3 (19)	0 (19)	32 (19)	2,7 ± 0,4 (19)
0,00	0,05	19 (31)	<b>c</b>	3,0 ± 0,7 (6)	0,3 ± 0,1 (6)	0 (6)	0 (6)	0,3 ± 0,1 (6)
0,01	0,00	12 (25)	<b>c</b>	1,0 ± 0,0 (3)	0,9 ± 0,3 (3)	0 (3)	67 (3)	1,2 ± 0,2 (2)
0,01	0,01	36 (25)	<b>b</b>	2,8 ± 0,4 (9)	0,9 ± 0,5 (9)	0 (9)	22 (9)	3,0 ± 2,0 (2)
0,01	0,05	17 (30)	<b>c</b>	3,8 ± 0,6 (5)	0,6 ± 0,2 (5)	0 (5)	20 (5)	1,5 (1)
0,05	0,00	15 (39)	<b>c</b>	2,2 ± 0,9 (6)	1,3 ± 0,4 (6)	0 (6)	33 (6)	2,7 ± 0,2 (2)
0,05	0,01	2 (41)	<b>c</b>	1,0 ± 0,0 (1)	4,5 (1)	0 (1)	100 (1)	4,5 (n=1)
0,05	0,05	23 (30)	<b>c</b>	1,7 ± 0,3 (7)	1,3 ± 0,6 (7)	0 (7)	43 (7)	2,6 ± 1,2 (3)

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott (p<0,05). (n) = número de repetições.



**Tabela 12.** Sobrevivência (%) e características da parte aérea dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., durante a fase de multiplicação em todos os tratamentos com BAP/AIB, no 90º dia do 6º subcultivo.

Tratamento BAP AIB (mg.L <sup>-1</sup> )		Sobrevivência (%)		Necrose do ápice (%)	
0,00	0,00	100 (31)	<b>a</b>	16 (31)	<b>b</b>
0,00	0,01	100 (30)	<b>a</b>	50 (30)	<b>a</b>
0,00	0,05	93 (31)	<b>b</b>	34 (31)	<b>a</b>
0,01	0,00	100 (25)	<b>a</b>	20 (25)	<b>b</b>
0,01	0,01	100 (25)	<b>a</b>	8 (25)	<b>b</b>
0,01	0,05	100 (30)	<b>a</b>	17 (30)	<b>b</b>
0,05	0,00	100 (39)	<b>a</b>	5 (39)	<b>b</b>
0,05	0,01	100 (41)	<b>a</b>	41 (41)	<b>a</b>
0,05	0,05	100 (30)	<b>a</b>	33 (30)	<b>a</b>

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ( $p < 0,05$ ). (n) = número de repetições.

### 3.5. Comparação do enraizamento *in vitro*, *ex vitro*, e na fase de multiplicação.

A comparação do enraizamento nos melhores tratamentos da fase de multiplicação (BAP/AIB 0,0/0,0; 0,00/0,01 e 0,01/0,01 mg.L<sup>-1</sup>), *in vitro* (sem carvão), *ex vitro* (em estufa) foi realizada, a fim de avaliar estatisticamente a condição mais adequada para *J. ulei*. A Tabela 13 apresenta os resultados. Observa-se que as maiores porcentagens de enraizamento foram observadas em 0,00/0,01 mg.L<sup>-1</sup> de BAP/AIB, em meio sem carvão e *ex vitro*, respectivamente

63%, 67% e 79%, e não diferem estatisticamente entre si. O número médio de raízes por planta, variou entre 2 e 3, e, da mesma forma que a média do comprimento da maior raiz acima de 1 cm, não diferiu estatisticamente nas diferentes condições de cultivo. O demais parâmetros analisados (comprimento médio da maior raiz, porcentagens de brotos com raízes laterais e de brotos com raízes de comprimento acima de 1 cm) foram significativamente superiores no enraizamento em estufa.

A porcentagem de sobrevivência foi elevada em todas as condições e não diferiram significativamente. Em condições *ex vitro* não ocorreu necrose dos ápices, que se mantiveram em desenvolvimento. Este resultado não foi estatisticamente diferente de 0,0/0,0; e 0,01/0,01 mg.L<sup>-1</sup> de BAP/AIB, respectivamente 16% e 8%. Nos demais tratamentos a porcentagem de brotos com ápices necrosados foi elevada (acima de 50%). A ocorrência de novas brotações se diferenciando nas gemas axilares, abaixo do ápice, foi observada em todas as condições, porém foi avaliada apenas *in vitro* (meio sem carvão) e *ex vitro*. Nestas duas condições, constatou-se que a formação de novas brotações está relacionada com necrose do ápice. *Ex vitro*, como não ocorreu necrose dos ápices, a porcentagem de brotos com novas brotações foi baixa (6%), enquanto que *in vitro*, estes dois parâmetros foram muito levados e significativamente diferentes, respectivamente, 71% e 75%.

**Tabela 13.** Comparação do enraizamento (%) e desenvolvimento do sistema radicular de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. em diferentes condições: durante a fase de multiplicação (BAP/AIB 0,0/0,0; 0,00/0,01 e 0,01/0,01 mg.L<sup>-1</sup>), *in vitro* (meio sem carvão) e *ex vitro* (estufa), no 90º dia de cultivo. Média ± erro padrão.

Condições de cultivo		Enraizamento (%)	Número de raízes	Comprimento da maior raiz (cm)	Brotos com raízes laterais (%)	Brotos com raízes ≥ 1 cm (%)	Comprimento da maior raiz (cm)
Multiplicação BAP/AIB (mg.L <sup>-1</sup> )							
0,00	0,00	48 <b>b</b> (31)	2,2 ± 0,4 <b>a</b> (15)	1,3 ± 0,5 <b>b</b> (15)	0 <b>b</b> (15)	40 <b>b</b> (15)	2,5 ± 1,2 <b>a</b> (15)
0,00	0,01	63 <b>a</b> (30)	2,4 ± 0,3 <b>a</b> (19)	1,2 ± 0,3 <b>b</b> (19)	0 <b>b</b> (19)	32 <b>b</b> (19)	2,7 ± 0,4 <b>a</b> (19)
0,01	0,01	36 <b>b</b> (25)	2,8 ± 0,4 <b>a</b> (9)	0,9 ± 0,5 <b>b</b> (9)	0 <b>b</b> (9)	22 <b>b</b> (9)	3,0 ± 2,0 <b>a</b> (2)
<i>In vitro</i> (sem carvão)		67 <b>a</b> (24)	2,9 ± 0,5 <b>a</b> (16)	2,1 ± 0,4 <b>b</b> (16)	0 <b>b</b> (16)	44 <b>b</b> (16)	3,8 ± 0,5 <b>a</b> (7)
<i>Ex vitro</i>		79 <b>a</b> (52)	2,1 ± 0,2 <b>a</b> (41)	4,6 ± 0,5 <b>a</b> (41)	34 <b>a</b> (41)	90 <b>a</b> (41)	5,0 ± 0,6 <b>a</b> (37)

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott (p<0,05). (n) = número de repetições.

**Tabela 14.** Comparação da sobrevivência (%) e das características da parte aérea dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., durante o enraizamento em diferentes condições: durante a fase de multiplicação (BAP/AIB 0,0/0,0; 0,00/0,01 e 0,01/0,01 mg.L<sup>-1</sup>), *in vitro* (meio sem carvão) e *ex vitro* (estufa), no 90<sup>o</sup> dia de cultivo.

Condições de cultivo		Sobrevivência (%)		Necrose do ápice (%)		Nova brotação (%)	
BAP AIB (mg.L <sup>-1</sup> )							
0,00	0,00	100 (31)	<b>a</b>	16 (31)	<b>c</b>	-	
0,00	0,01	100 (30)	<b>a</b>	50 (30)	<b>b</b>	-	
0,01	0,01	100 (25)	<b>a</b>	8 (25)	<b>c</b>	-	
<i>In vitro</i> (sem Carvão)		100 (24)	<b>a</b>	71 (24)	<b>a</b>	75 (24)	<b>a</b>
<i>Ex vitro</i>		98 (52)	<b>a</b>	0 (51)	<b>c</b>	6 (51)	<b>b</b>

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ( $p < 0,05$ ). (n) = número de repetições.

## 4. Aclimatização

A aclimatização das plantas foi realizada em estufa e posteriormente em casa de vegetação.

### 4.1. Estufa

Os brotos enraizados *ex vitro* e enraizados durante a fase de multiplicação foram aclimatizados em estufa.

#### 4.1.1. Brotos enraizados *ex vitro*

Todas as 6 plantas transferidas para viveiro morreram após 3 meses de cultivo, por esta razão as demais foram mantidas na estufa. No 18<sup>o</sup> mês de cultivo, a sobrevivência dessas das plantas (n=41) foi de 71%. De maneira geral, apenas uma planta se desenvolveu por recipiente de cultivo. A figura 12 ilustra o

aspecto das plantas enraizadas, apresentando o vigor da parte aérea, que se desenvolveu (cf. Figura 10b), aumentando o número de nós e o comprimento dos entrenós (dados não apresentados). As folhas compostas se expandiram e, número de folíolos crescente da base para o ápice, variou entre 3 e 5 nos nós mais inferiores e de 7 a 9 nos nós superiores (cf. Figura 12a).

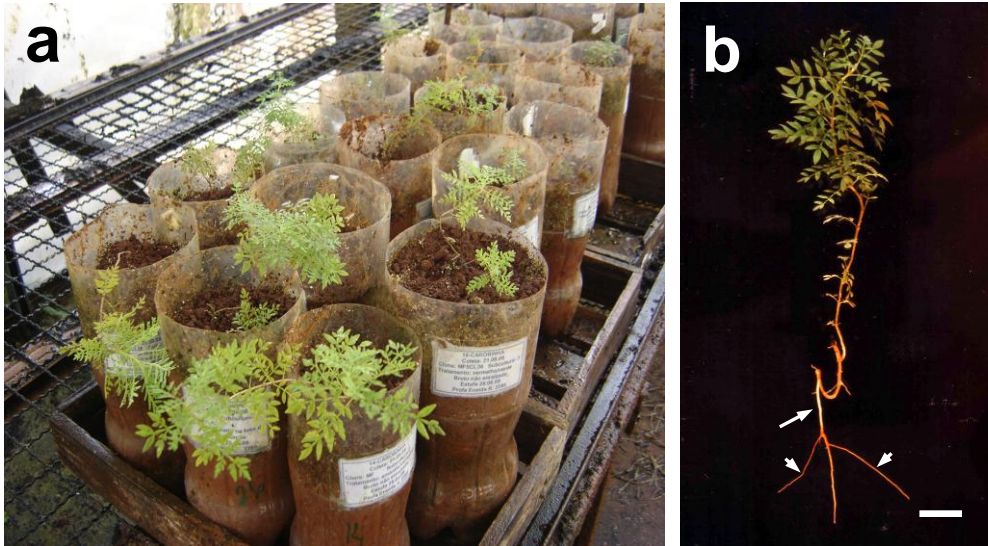
O sistema radicular, nesta fase, ainda menos desenvolvido do que a parte aérea (Figura 12b), apresenta uma raiz adventícia axial mais longa e algumas raízes laterais. Em todas as plantas observadas formaram uma curvatura mais ou menos acentuada na região da base do caule com a raiz adventícia axial (Figura 12b).

#### **4.1.2. Brotos enraizados durante a fase de multiplicação**

No 90<sup>o</sup> dia de cultivo a sobrevivência das plantas (n=11) foi de 82%. No 18<sup>o</sup> mês o desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular era semelhante ao dos brotos enraizados *ex vitro*. (Figura 12). No 24<sup>o</sup> mês a sobrevivência permaneceu 82%.

#### **4.2. Casa de vegetação**

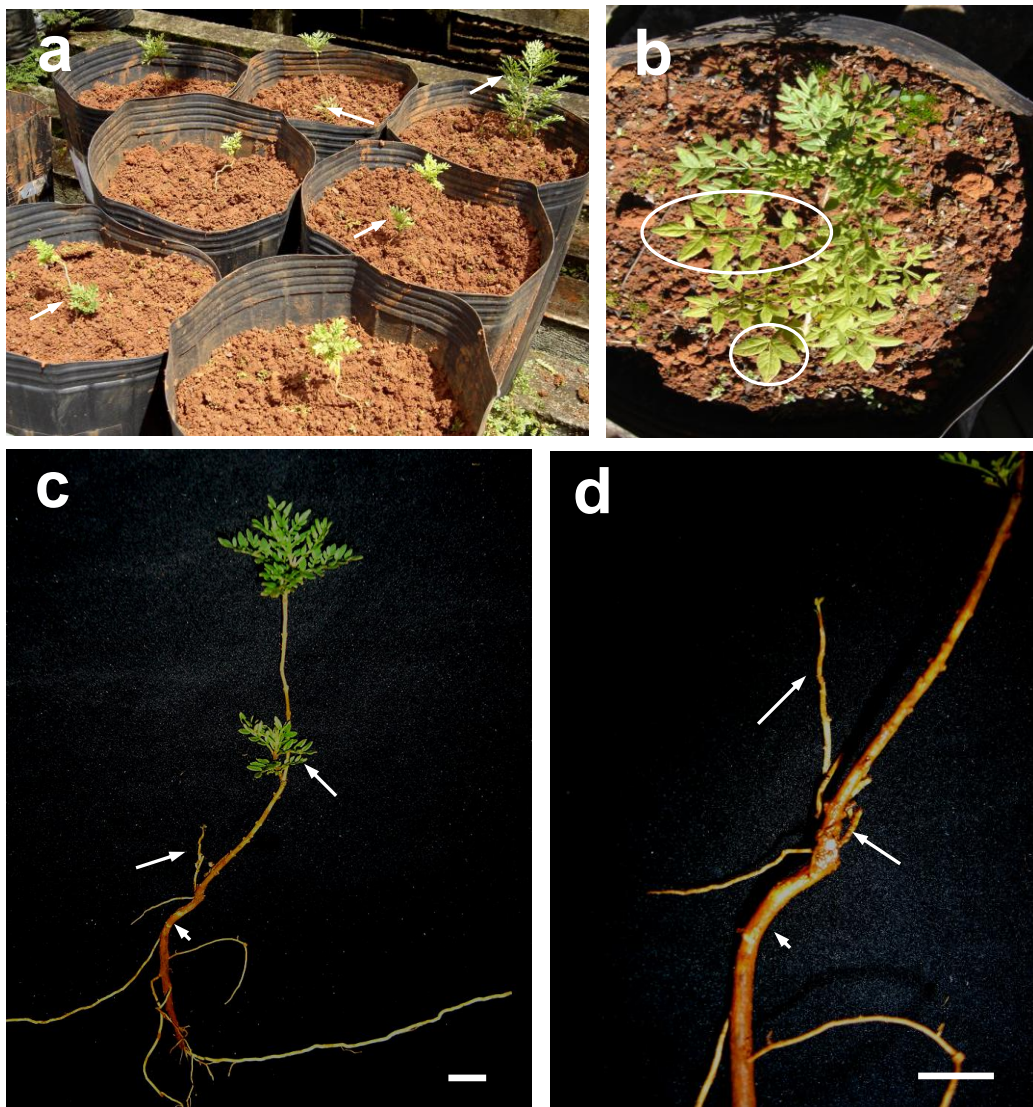
As plantas transplantadas para vasos de polipropileno e cultivadas durante seis meses em casa de vegetação (totalizando 24 meses de aclimatização), apresentaram 100% de sobrevivência.



**Figura 12.** Plantas de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae) multiplicados *in vitro* e enraizadas *ex vitro*, durante a fase de aclimatização em estufa, após 18 meses de cultivo em latossolo vermelho. a. Aspecto geral das plantas, apresentado o vigor da parte aérea. b. Detalhe do sistema radicular desenvolvido com uma raiz adventícia axial (seta longa) e duas raízes laterais (setas curtas). Barra = 1 cm.

A parte aérea vigorosa (Figuras 13 a-c) apresentou alongamento entre 15 e 20 cm de comprimento. A formação de novas brotações na parte aérea foi observada em 57% das plantas (Figuras 13 a e c). As folhas, até então, compostas de 3, 5, 7 ou 9 folíolos, começam, gradativamente, a adquirir, nos níveis superiores, a morfologia bipinada (Figura 13b).

O sistema radicular se desenvolveu com o espessamento e alongamento de uma raiz axial, com cerca de 25 cm de comprimento e numerosas raízes laterais (Figura 13c). Além disso, observou-se a presença de jovens brotações se desenvolvendo a partir da estrutura subterrânea, formada na região da base do caule com a raiz adventícia axial (Figuras 13 c-d).



**Figura 13.** Plantas de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*. Fase de aclimatização em casa de vegetação, após 24 meses de cultivo em latossolo vermelho. a. Aspecto geral das plantas, apresentado o vigor da parte aérea, com novas brotações (setas) se desenvolvendo a partir do caule. b. Detalhe das folhas compostas, na base do caule, e diferenciação gradativa em bipinadas, nos níveis superiores (círculos). c. Planta apresentado brotações (setas) e sistema radicular com uma raiz adventícia axial (cabeça de seta) e várias raízes laterais. d. Detalhe das jovens brotações (setas), se desenvolvendo a partir da estrutura subterrânea (região da conexão da raiz axial com o caule), a qual apresenta espessamento e curvatura (cabeça de seta) característicos de xilopódio. Barra = 1,5 cm.

## DISCUSSÃO

### 1. Fase de estabelecimento

#### 1.1. Desinfestação

A desinfestação dos explantes é uma das etapas primordiais para a cultura de tecidos (Srivastava *et al.* 2010). Uma das maiores dificuldades nesta fase consiste em obter explantes axênicos e vivos após o tratamento de desinfestação (Gratapaglia & Machado 1998). Para superar esta limitação, a germinação de sementes *in vitro* tem sido muito utilizada na fase de estabelecimento de espécies do cerrado (Moreira *et al.* 2000; Nicioli *et al.* 2008; Silva *et al.* 2008; Martins *et al.* 2011).

Em *J. ulei*, sementes coletadas de cinco diferentes matrizes, apresentaram elevadas porcentagens de desinfestação, acima de 95%, indicando que a imersão em álcool 70%, por 1 min, e hipoclorito de sódio comercial, por 15 min, são suficientes para descontaminar as sementes da espécie. Protocolos semelhantes foram igualmente eficientes para desinfestar sementes de plantas nativas como *Kielmeyera coriacea* (Arellano & Pinto 1993), *Jacaranda mimosaeifolia* (Maruyama 2003) e *Alibertia edulis* (Silva *et al.* 2008). Estes procedimentos são de extrema importância visto que facilitam a propagação das espécies do Cerrado, proporcionando o uso racional e sustentável da flora do Bioma.



## 1.2. Germinação e morfologia da plântula e da planta jovem

A germinação em plantas é um processo fisiológico complexo que se inicia com a embebição da semente e termina com a emergência da radícula (Labouriau 1983; Bewley & Black 1994). O vigor da germinação é determinado pela capacidade do embrião, incorporado no interior da semente, em retomar suas atividades metabólicas de forma coordenada e sequencial (Rajjou *et al.* 2012). No Cerrado é relativamente comum encontrar espécies nativas que possuem baixa germinabilidade, o que é compensado com sistemas de propagação vegetativa (Hoffman 1998; Silva *et al.* 2009).

É também frequente no cerrado a ocorrência de espécies nas quais a germinação ocorre após um período de dormência. Diversos mecanismos de dormência já foram relatados incluindo a impermeabilidade do tegumento, dormência fisiológica e inibidores de germinação (Baskin & Baskin 2004). Essa situação não foi observada em *J. ulei*, pois a germinação das sementes se iniciou 10 dias após a inoculação e, de maneira geral, a germinabilidade foi elevada, acima de 90% em 30 dias de cultivo. Esses resultados indicam que as sementes da espécie não possuem dormência.

Entretanto, a germinabilidade foi significativamente inferior em uma das matrizes, que apresentou 75%. Este resultado indica que o potencial germinativo das sementes pode variar mesmo entre plantas de uma mesma população. Isso mostra a importância da seleção de matrizes, para identificar a procedência das sementes e analisar separadamente a germinabilidade de cada uma, a fim de garantir a domesticação da espécie com vistas ao seu uso racional. É importante mencionar que as sementes usadas nestes experimentos foram recém-coletadas (até três meses de coleta). Estudos adicionais mostraram que nas sementes com

tempo de coleta superior a seis meses, a germinabilidade foi sensivelmente reduzida, como é característico de outras espécies do gênero *Jacaranda* (Lorenzi 1992) e *Tabebuia* (Pinto *et al.* 1986), que perdem a viabilidade rapidamente, em geral após três ou quatro meses de coleta.

Sementes que não toleram dessecação, a graus de umidade entre 15% e 20%, são classificadas como recalcitrantes (Roberts 1973). Embora, a perda de água pelas sementes recalcitrantes resulte no declínio da viabilidade, existe uma gradação considerável na sensibilidade à dessecação (Fonseca & Freire 2003). Com base nessa gradação, Farrant *et al.* (1988) propuseram que as sementes recalcitrantes podem ser classificadas em “altamente”, “moderadamente” e “minimamente” recalcitrantes. Dentro dessa perspectiva as sementes de *J. ulei* se enquadrariam como moderadamente recalcitrantes, devido a perda de viabilidade de boa parte das sementes. Por outro lado, Wetzel (1997) observou que essa espécie não teve perda significativa da viabilidade das sementes após dessecação, ou seja, as sementes de *J. ulei* teriam um perfil ortodoxo. Assim, são necessários mais estudos sobre a germinabilidade dessa espécie para determinar as causas dessa inconsistência.

Estudos sobre a ontogênese de plântulas e plantas jovens têm sido realizados com diversas finalidades, entre elas para ampliar o conhecimento sobre determinada espécie ou agrupamento sistemático de plantas, para facilitar a identificação de plantas de uma região, dentro de um enfoque ecológico (Oliveira 1993), bem como para auxiliar na identificação de espécies em estudos de regeneração natural de áreas degradadas (Araújo Neto *et al.* 2002).

As plântulas e plantas jovens de *J. ulei* apresentam folhas compostas imparipinadas e opostas desde o primeiro par de eófilos, como é característica da família (Barroso *et al.* 1991; Costa *et al.* 2011). Entretanto diferem da planta

adulta, a qual possui folhas bipinadas (cf. Figura 1a). A folha composta das plantas jovens de 120 dias de cultivo *in vitro* apresenta número crescente de folíolos (três, cinco e sete), semelhante às folhas das brotações da raiz da planta adulta crescendo no campo (cf. Figura 2b), confirmando para a espécie que brotações do sistema radicular apresentam características juvenis.

Nas plantas normais, até 120 dias de cultivo, a raiz primária se alonga, porém praticamente não há desenvolvimento do sistema radicular por meio da formação de raízes laterais. O alongamento da raiz primária, logo após a germinação, é o padrão comum nas espécies do Cerrado, como ocorreu em *J. ulei*, porém a formação de raízes laterais é geralmente precoce, como em *Byrsonima basiloba* e *Eugenia dysenterica*, germinadas *in vitro*, em condições semelhantes, que iniciam a expansão de raízes laterais respectivamente a partir do 14<sup>o</sup> e 45<sup>o</sup> dia de cultivo (Silveira *et al.* 2012).

Estudos morfológicos de plântulas e de plantas jovens indicam que, em geral, a conexão da base do hipocótilo com a raiz pivotante é uma estrutura contínua verticalmente (Oliveira 2001). A conexão lateral da raiz no xilopódio foi observada tanto em *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Palhares & Silveira 2007), como também em *Byrsonima basiloba* (Silveira *et al.* 2012), ambas espécies xilopodióforas do Cerrado. Em plântulas de *J. ulei*, este tipo de conexão lateral também foi observada, isso é, a região do coleto é oblíqua, em relação ao caule.

A ocorrência de plântulas anormais é comumente relatada na literatura, inclusive para outras espécies da família, como em *Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl., na qual foi registrado 20% de plantas anormais, em um lote de sementes que apresentou 73% de germinação (Gemaque *et al.* 2002). No Cerrado estas anormalidades estão frequentemente associadas à má formação do sistema radicular, de maneira geral pela necrose ou degeneração da região apical da raiz

primária (Cury 2008; Silveira *et al.* 2012), como ocorreu em *J. ulmi*. Porém, como em *Byrsonima basiloba* (Pereira 2002), as partes aéreas destas plantas produzem explantes áptos a serem utilizados na fase de multiplicação.

Para *J. ulmi*, estudos sobre a ontogenia de indivíduos juvenis são inexistentes na literatura. Assim, os resultados ora apresentados poderão contribuir para a caracterização dos diferentes estágios do desenvolvimento a espécie, como também para avaliar a fidelidade morfológica das plantas produzidas por cultura de tecidos, em relação às plantas produzidas em condições naturais.

## **2. Fase de multiplicação**

### **2.1. Efeito da diluição do meio MS**

Para micropropagação de espécies lenhosas, na fase de multiplicação e subcultivos, a diluição do meio MS tem se mostrado efetiva (Silva *et al.* 2008). Em geral, a diluição mais frequentemente utilizada é a metade para macro e microelementos, como observado em *Vitis vinifera* (Akbas *et al.* 2004) *Stryphnodendron polyphythum* (França *et al.* 1995), *Kielmeyera coriacea* (Pinto *et al.* 1994), *Acacia mearnii* (Quoirin *et al.* 2001), *Stryphnodendron adstringens* (Nicioli *et al.* 2008) e *Macrosyphonia velame* (Martins *et al.* 2011).

Outras diluições do meio MS também têm apresentado resultados relevantes na multiplicação de plantas por cultura de tecido. Na propagação de *Alibertia edulis*, macro e microelementos de MS diluídos a quarta parte favoreceram o desenvolvimento de brotações vigorosas na fase de multiplicação e nos subcultivos sucessivos (Silva *et al.* 2008). Da mesma forma, explantes

provenientes de plântulas de *J. ulei*, com 60 dias cultivo na fase anterior, foram multiplicados em meio ¼ MS, como indicado por Fukuda *et al.* (2009), no qual foi observado a formação de multibrotações em todos os subcultivos realizadas, indicando que esta diluição é adequada a propagação da espécie.

## 2.2. Multiplicação e subcultivos

Na fase de multiplicação o objetivo é estabelecer as condições que propiciem a obtenção do maior número de brotos possível, porém, é imprescindível que sejam vigorosos e sem sintomas de vitrificação, clorose ou nanismo. Para isso, uma citocinina, combinada ou não com uma auxina, normalmente é adicionada ao meio de cultura. A concentração ideal desses reguladores de crescimento deve assegurar a manutenção da taxa de multiplicação e o vigor das brotações nos subcultivos sucessivos e a produção de brotos aptos a serem enraizados na fase seguinte.

Para atender a estes objetivos, considerando que *J. ulei* é uma espécie subarborescente, portanto com as gemas laterais menos inibidas pela da dominância apical, optou-se por testar concentrações baixas, da ordem de 1/100, de BAP e AIB. Nos tratamentos testados, nos quatro subcultivos sucessivos, de maneira geral, o número de brotos variou entre 1 e 2, com exceção de alguns tratamentos do segundo subcultivo cujas as médias ficaram em torno de 3. Embora estes valores não sejam considerados elevados, eles são semelhantes aos observados em outras espécies do Cerrado, como em *Macrosyphonia velame*, também de porte arbustivo, na qual 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de BAP promoveu a proliferação de 4,4 brotos por explante (Martins *et al.* 2011) ou em *Stryphnodendron polyphytum* (França *et al.* 1995) e *Stryphnodendron adstringens* (Nicioli *et al.* 2008), ambas e

arbóreas, que apresentaram, respectivamente, 3,6 e 3 brotos por explante, como maiores taxas de proliferação, em concentrações de BAP 100 vezes mais elevadas. É importante assinalar que, nessas espécies, esses resultados foram observados em um único subcultivo, e, portanto, não estão assegurados nos subcultivos seguintes.

Em *J. ulmi*, as médias mais elevadas de número de brotos, observadas no do segundo subcultivo (2,8 e 3 brotos por explante), indicam que a espécie apresenta potencial para aumentar a taxa de multiplicação. Isso poderia ser alcançado com o aumento da concentração de BAP. Entretanto, na maior concentração testada, 0,05 mg.L<sup>-1</sup>, combinada com a mesma concentração de AIB, embora tenha sido observado os maiores comprimentos de brotos (3,5 cm e 2,7 cm, respectivamente no 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> subcultivos), foram observados sintomas de vitrificação dos brotos, como redução no tamanho dos folíolos. Essas características sugerem que concentrações superiores poderiam acentuar estes sintomas. Assim, uma alternativa para maximizar a brotação em *J. ulmi* seria testar outras citocininas e selecionar genótipos que se adaptem às condições testadas.

Em *J. ulmi*, o comprimento médio dos brotos aumentou ou se manteve em todos os tratamentos até o 3<sup>o</sup> subcultivo. O maior valor foi 3,5 cm, observado em BAP/AIB 0,05/0,05 mg.L<sup>-1</sup>, porém, comprimentos acima de 1,5 cm ocorreram em quase todos os tratamentos nos diferentes subcultivos. Brotos com comprimentos dessa ordem são adequados ao enraizamento direto, isso quer dizer que a espécie não necessita de uma fase especial para o alongamento. Estes valores também indicam que o padrão de multiplicação de *J. ulmi* não é o de produzir multibrotações com grande número de brotos e sim, brotos longos que podem ser excisados em dois ou mais explantes, o que aumentaria em muito a taxa de multiplicação. Para avaliar este padrão, novos experimentos devem ser realizados

contabilizando a multiplicação pelo número de explantes produzidos por broto, ao invés do número de brotos por explante, como foi feito.

Porém, com base nos resultados dos experimentos realizados nesse trabalho, embora em todos os tratamentos os explantes tenham apresentado desenvolvimento, o tratamento BAP/AIB 0,05/0,05 mg.L<sup>-1</sup> favoreceu simultaneamente as maiores médias de multiplicação (dois brotos por explante) e comprimento (3,5 cm), sendo portanto o mais indicado para a espécie.

Adicionalmente, em todos os subcultivos é interessante notar que os explantes do tratamento controle, ou seja, sem reguladores de crescimento, apresentaram uma taxa de multiplicação similar àqueles que continham essas substâncias. Resultado semelhante foi também verificado, em um único subcultivo, por Martins *et al.* (2011), com *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) (velame), onde o meio sem adição de citocinina promoveu a proliferação de brotos (quatro brotos por explante). Da mesma forma, Mantovani *et al.* (1999) constataram que a multiplicação, crescimento e qualidade das brotações de caixeta (*Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch.) foram melhores na ausência do que na presença de BAP ou TDZ exógeno e que a presença dessas substâncias diminuíram os parâmetros analisados.

Vários estudos realizados com espécies endêmicas do Cerrado têm confirmado que, de modo geral, ausência ou reduzidas concentrações de citocininas são mais adequadas ao desenvolvimento *in vitro* dessas espécies (Martins *et al.* 2011). Porém, em subcultivos sucessivos sem substâncias de crescimento, normalmente os explantes não resistem ou, quando isso ocorre, não produzem novas brotações, como ocorreu em *Alibertia edulis* (Silva *et al.* 2008), a partir do 1º subcultivo. Em *J. ulei* esta capacidade se manteve em valores comparáveis aos apresentados na maioria dos outros tratamentos, em todos os

subcultivos. Isso pode inferir que os explantes dessa espécie não necessitam da adição de reguladores de crescimento no meio de cultura quando cultivados *in vitro*. Esse fato sugere que os explantes tenham capacidade de produção endógena de hormônios em quantidades suficientes para a manutenção da organogênese. Concomitantemente, é também possível que esses explantes sejam insensíveis a reguladores de crescimento exógenos. Em *Pinus pinea* foi observado que os explantes adquiriram insensibilidade à presença de citocinina exógena com o tempo (Valdés *et al.* 2001). Entretanto nossas observações se tornam ainda mais interessantes, visto que, em *J. ulei*, os explantes não se tornam insensíveis à presença de reguladores de crescimento com a idade, mas já manifestam essa característica desde o primeiro subcultivo. Estudos visando à determinação dos níveis hormonais endógenos, como já realizado para outras espécies nativas do Brasil (Peres *et al.* 1997), poderiam elucidar sobre a capacidade dos explantes de *J. ulei* em produzir estas substâncias.

Finalmente, a redução nas médias de multiplicação e comprimento, observadas no 4<sup>o</sup> subcultivo, ocorreu em decorrência da transferência das culturas para a sala de cultivo das novas instalações do Laboratório de Cultura de Tecidos. No momento da transferência nem todas as condições estavam adequadamente ajustadas o que reduziu o desenvolvimento das brotações. Nos subcultivos seguintes (5<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> subcultivos) os resultados foram semelhantes aos observados no 3<sup>o</sup> subcultivo (dados não apresentados).

### **3. Enraizamento e desenvolvimento da parte aérea**

O enraizamento de brotos multiplicado por cultura de tecidos pode ser realizado *in vitro* ou *ex vitro*. Estes dois processos foram testados para *J. ulei*,



neste trabalho, e, em ambos os casos os resultados foram observados aos 90<sup>o</sup> dia de cultivo.

### 3.1. Enraizamento *in vitro*

*In vitro*, o enraizamento é normalmente obtido em soluções minerais diluídas e em presença de uma auxina (Melo *et al.* 2008). Em *Jacaranda mimosaeifolia*, mesmo gênero da espécie em estudo, 100% de enraizamento foi observado em meio ½B5, suplementado AIB sozinho ou combinado com ANA, enquanto que, em ½ MS, nas mesmas condições hormonais, foi de 80% (Maruyama 2003). Estes resultados sugerem que soluções minerais menos concentradas podem ser mais adequadas ao enraizamento *in vitro* do gênero *Jacaranda*.

Para espécies que apresentam dificuldades de enraizar, como muitas espécies lenhosas, outras substâncias podem ser adicionadas ao meio de cultura, a fim de aumentar a porcentagem de enraizamento e a qualidade das raízes. Um exemplo é carvão ativado, que propiciou o enraizamento de brotos de *Dalbergia miscolobium* (Pereira de Sá 1991), espécie do Cerrado, e melhorou a qualidade do sistema radicular de *Fraxinus americana* e *F. pennsylvanica* (Preece *et al.* 1987).

O enraizamento *in vitro* de *J. ulei* foi testado em meio ¼ MS, com ou sem carvão. No meio sem carvão, 69% dos brotos enraizaram, com média de 2,9 raízes por broto e 2,1 cm de comprimento da maior raiz. Embora este resultado possa ser considerado satisfatório, apenas 44% dos brotos enraizados apresentaram raízes maiores que 1 cm, isto é, de forma geral eram raízes curtas, que via de regra não proporcionam bons resultados nas fases seguintes, embora

este resultado possa variar de espécie para espécie e não seja consenso na literatura (Grattapaglia & Machado 1998). Além disso, foi observada a ocorrência de necrose dos ápices radiculares e não houve formação de raízes laterais. A ausência de raízes laterais pode limitar a absorção de minerais e conseqüentemente o desenvolvimento das brotações, comprometendo a aclimatação das plantas (Santos *et al.* 2006).

Em *J. ulei*, a adição de carvão, na concentração testada (10 g.L<sup>-1</sup>), inibiu completamente a diferenciação de raízes, embora tenha sido observada a formação de um pequeno calo na base dos brotos. O acréscimo de AIB ao meio com carvão não melhorou estes resultados. Nesses tratamentos, a necrose da parte apical dos brotos foi elevada (100% com carvão e 71% sem carvão), sendo que a formação de novas brotações ocorreu apenas no meio sem carvão e em 75% dos brotos.

Resultados antagônicos são comuns na literatura, como em *Alibertia edulis*, para a qual presença de carvão é indispensável à diferenciação de raízes. Nessa espécie, o meio com ou sem AIB, e a mesma concentração de carvão utilizada para *J. ulei* resultou em 100% de enraizamento (Silva *et al.* 2008). A presença de carvão (2 g.L<sup>-1</sup>) e de AIB também favoreceram o desenvolvimento do sistema radicular de *Caryocar brasiliense* (Santos *et al.* 2006), também do Cerrado.

### **3.2. Enraizamento *ex vitro* em estufa**

De maneira geral, o enraizamento *ex vitro* é testado quando os resultados *in vitro* não foram satisfatórios, embora apresente as vantagens de reduzir o período de cultivo *in vitro*, o trabalho em laboratório e conseqüentemente os custos de produção (Hazarika 2006, Martins *et al.* 2011). *Ex vitro*, o enraizamento

de *J. ulei* foi realizado em vermiculita e em estufa. Nessas condições, 79% dos brotos enraizaram, com médias de 2,1 raízes por broto e 4,6 cm de comprimento da maior raiz. O sistema radicular se desenvolveu, sem necrose dos ápices radiculares, formando raízes laterais em 34% dos brotos e 90% dos brotos enraizados apresentaram raízes com 5 cm. Além disso, não ocorreu necrose apical dos brotos e apenas 6% das plantas desenvolveram novas brotações.

Observações de campo, em plantas adultas de *J. ulei*, indicam que existe uma correlação na sucessão da emissão de novas brotações na região da base do caule com o sistema subterrâneo. Parece que a emissão de brotações está condicionada a morte de brotações anteriores, provavelmente induzidas por algum fator de estresse, de forma que a planta permanece com poucas brotações basais, de maneira geral, entre uma e três (cf. Figura 2a). Essas observações podem indicar que o desenvolvimento das plantas micropropagadas é semelhante ao da planta em condições naturais.

A ausência de necrose apical, baixa porcentagem de plantas emitindo novas brotações (6%) e o desaparecimento dos sintomas de vitrificação confirmam que as condições em estufa são mais adequadas ao enraizamento de *J. ulei*. Segundo Pospíšilová *et al.* (1999), as condições de cultivo *in vitro* podem resultar na formação de plantas com morfologia, anatomia e fisiologia anormais, porém, após a transferência *ex vitro*, essas mudas podem facilmente corrigir as anormalidades.

O estudo morfo-anatômico da base dos brotos, onde se diferenciaram as raízes adventícias, permitiu confirmar que não houve formação de calos entre a raiz e o caule e que a vascularização da raiz se conecta diretamente a do caule. A presença de calos na base do broto, nesta fase, dificulta o transporte principalmente de água e sais minerais e pode comprometer o desenvolvimento

das plantas nas fases seguintes (Silveira & Cottignies 1994; Andrade *et al.* 2000). A hidrólise do amido presente nas células da base da estaca, durante o enraizamento, parece estar relacionada com a desdiferenciação de células que darão origem aos primórdios de raiz, uma vez que a fotossíntese nos brotos é relativamente baixa e a formação de raízes é um processo que requer energia proveniente de carboidratos (Assis & Teixeira 1998).

### **3.3. Enraizamento durante a fase de multiplicação (*in vitro*)**

A diferenciação e alongamento de primórdios radiculares não são comuns durante a fase de multiplicação. De acordo com Assis & Teixeira (1998), em geral, a presença de citocininas exógenas inibe o enraizamento, embora possam estimular, em algumas espécies, quando utilizadas em baixas concentrações. Em *J. ulmi*, a formação e o alongamento de raízes foram observados durante a fase de multiplicação. No 90<sup>o</sup> dia do 6<sup>o</sup> subcultivo, em todos os tratamentos, cada explante formou entre 1,0 e 3,8 de raízes adventícias, pouco alongadas (0,3 a 1,3 cm) e não ramificadas. As maiores porcentagens de enraizamento ocorreram na ausência de reguladores de crescimento ou nas combinações BAP/AIB 0,00/0,01 e 0,01/0,01 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente 48%, 63% e 36%, indicando que concentrações acima de 0,01 mg.L<sup>-1</sup>, tanto de BAP, como de AIB inibem o enraizamento.

### **3.4. Comparação do enraizamento *in vitro*, *ex vitro*, e na fase de multiplicação**

A comparação dos resultados observados durante uma fase de enraizamento *in vitro* ou *ex vitro*, discutidos acima, confirmam a necessidade da realização de uma fase específica para o desenvolvimento do sistema radicular de *J. ulei*.

Entretanto, na micropropagação dessa espécie, alguns aspectos relacionados ao seu desenvolvimento no campo e sua utilização econômica devem ser considerados. *J. ulei* é um subarbusto com potencial ornamental, que em condições naturais produz poucos ramos, e, portanto poucos cachos de flores por indivíduo, além de ter crescimento lento. Desta forma, o enraizamento de multibrotações *ex vitro*, ao invés de brotos isolados, pode representar uma alternativa, para a produção de mudas com muitos ramos, visando sua utilização na forma de maciços, em projetos de paisagismo. Além disso, este procedimento pode aumentar a produção de folhas, órgão medicinal comercializado (Nunes *et al.* 2003), que são, de maneira geral, pouco numerosas nos indivíduos crescendo no campo.

## **4. Aclimatização e desenvolvimento de plantas xilopodióforas do Cerrado**

As espécies arbóreas e arbustivas do Cerrado são caracterizadas por possuírem desenvolvimento lento nos primeiros anos de vida. A literatura afirma que nesses anos a planta investe grande parte da energia produzida no desenvolvimento do sistema radicular (Palhares & Silveira 2007; Silveira *et al.* 2012).

Outra peculiaridade dessas espécies é a presença de estruturas subterrâneas, fundamentais para a sobrevivência das plantas no campo, pois permitem que resistam às secas e às queimadas periódicas a que são submetidas, protegendo-as da destruição e capacitando-as para rebrotar (Rizzini & Heringer 1961; Appezzato-da-Glória 2003). Assim, muitos parâmetros utilizados para avaliar o crescimento e desenvolvimento em espécies de outros biomas, não são os mais indicados para as plantas do Cerrado.

A grande maioria dos trabalhos sobre a micropropagação de lenhosas apresentam os dados até a fase de aclimatização, que geralmente é avaliada até três meses de cultivo (Maruyama 2003; Martins *et al.* 2011), período raramente ultrapassado (Chinnappan *et al.* 2011). Considerando as características da vegetação do Cerrado, este período pode não ser suficiente para inferir sobre a sobrevivência e o desenvolvimento do sistema radicular em longo prazo, ainda na fase da aclimatização e posteriormente na aclimatação.

Observações de campo mostram que *J. ulei* é uma espécie com características típicas de plantas do Cerrado, apresentando, em condições naturais, desenvolvimento lento, tanto da parte aérea, quanto do sistema radicular e possuindo estrutura subterrânea semelhante a um xilopódio (cf. Figura 2a). Por esta razão, a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas micropropagadas, como um todo, estão sendo avaliados continuamente, embora os dados apresentados neste trabalho tenham sido coletados até 24 meses; inicialmente em estufa, até 18 meses e, posteriormente após transferência, em casa de vegetação, até 24 meses.

Em estufa, tanto as plantas enraizadas *ex vitro*, quanto àquelas enraizadas diretamente nos tratamentos de multiplicação, apresentaram elevada sobrevivência, respectivamente 71% e 82%. Resultados semelhantes foram

encontrados em outras espécies do Cerrado como *Jacaranda mimosaeifolia* (Maruyama 2003) e *Gomphrena officinalis* (Mercier 1992), porém, é comum observar porcentagens mais baixas, entre 40 e 50%, como em *Stryphnodendron adstringens* (Nicioli *et al.* 2008) e *Macrosyphonia velame* (Martins *et al.* 2011).

O aspecto morfológico da parte aérea é o principal fator utilizado para avaliar o vigor das plantas, durante a fase de aclimatização. Caules alongados com folhas sem sintomas de deficiência nutricional são importantes critérios para inferir sobre o desenvolvimento das plantas micropropagadas (Silva *et al.* 2008). Entretanto, para as plantas do Cerrado, o acompanhamento do sistema radicular é tão ou mais importante, considerando que, de maneira geral, apresenta, comparativamente com o caule, maior crescimento. Além disso, em espécies lenhosas, é comum caules alongados morrerem e surgirem jovens brotações, que dão continuidade ao desenvolvimento da planta (Palhares & Silveira 2007). Esta característica foi observada em *J. ulei*, de forma que as plantas de 18 e 24 meses de aclimatização (cf. Figuras 12a e 13a) apresentaram grande variação no comprimento médio da parte aérea (dados não apresentados) e no desenvolvimento das folhas (cf. Figura 13b), que são compostas imparipinadas, com número de folíolos crescente da base para o ápice do caule e bipinadas, nos níveis superiores das plantas mais desenvolvidas, como na planta adulta crescendo em condições naturais.

Para avaliar o desenvolvimento do sistema radicular é necessário eliminar o substrato e expor as raízes às condições ambientais. Com raras exceções (Palhares & Silveira 2007), muitas espécies são sensíveis a este procedimento e não sobrevivem, mesmo que replantadas rapidamente. Embora considerando a necessidade de avaliar a sobrevivência das plantas de *J. ulei* micropropagadas a longo prazo, dados do sistema radicular não foram coletados. Porém a descrição

morfológica preliminar indica que as plantas de 18 e 24 meses apresentaram uma curvatura mais ou menos acentuada entre o caule e a raiz axial de origem adventícia (cf. Figuras 12 b e 13b). Essa região se espessa e emite brotações (cf. Figura 13b), semelhante a um xilopódio. Estruturas subterrâneas, tipo xilopódio, podem ser de origem caulinar, radicular ou mista (Rizzini & Heringer 1961; 1966; Milanez & Moraes-Dallaqua 2003; Appezzato-da-Glória & Cury 2011).

Em plantas micropropagadas a presença de xilopódio ainda não foi relatada na literatura, embora seja imprescindível para a sobrevivência e o desenvolvimento em condições de campo. A formação de estruturas subterrâneas em plantas propagadas *in vitro* pode também contribuir para elucidar sobre a origem dessas estruturas. De acordo com Paviani (1977), em *Brasília sickii* a presença de xilopódio é determinada geneticamente, uma vez que o início de sua formação já é observado em plântulas de dois meses. Por outro lado, em *Mimosa multipina*, a formação do xilopódio ocorre em função do fator edáfico, como a alta compacidade do solo. Neste caso, o clima exerce papel secundário, favorecendo ou retardando o desenvolvimento do xilopódio (Rizzini 1963).

Em *Pachyrhizus ahipa*, observações realizadas tanto no campo, quanto em casa-de-vegetação não permitiram estabelecer qual é o fator responsável pela formação do xilopódio (Milanez & Moraes-Dallaqua 2003). Em *J. ulei*, plântulas de e dois meses crescendo *in vitro* (cf. Figura 3d) e plantas micropropagadas com 18 meses em estufa irrigada automaticamente, isso é, sem estresse hídrico, não apresentaram espessamento característico de xilopódio. Entretanto, plantas de 24 meses transferidas para casa de vegetação, sem controle automático da irrigação, o espessamento se desenvolveu e em alguns casos até emitiu brotação (cf. Figura 13d). Esses resultados sugerem que, em *J. ulei*, a formação de uma estrutura subterrânea, do tipo xilopódio, pode ser induzida por fatores ambientais



e, neste caso, as plantas micropropagadas teriam capacidade de se desenvolver normalmente em condições naturais. Estudos morfo-anatômicos em plântulas, plantas jovens e adultas, bem como em plantas micropropagadas, nas fases de aclimatização e aclimatação, devem ser realizados afim de definir a origem e o tipo de estrutura, bem como sua importância na sobrevivência das plantas em condições de campo.

Nas plantas de 18 meses foi observado a diferenciação e o alongamento de duas ramificações, que se desenvolveram, adquirindo dimensões semelhantes ao da raiz axial, enquanto nas plantas de 24 meses, de maneira geral, a raiz axial se alongou mais do que as outras. Em indivíduos jovens de *Brosimum gaudichaudii* provenientes de semente, foi relatada a presença de três raízes pivotantes, igualmente desenvolvidas, embora uma raiz pivotante seja provavelmente o padrão mais comum nessa espécie (Palhares & Silveira 2007). Apesar de pouco estudadas, estas variações parecem ser comuns em plantas do Cerrado, pois também foram observadas em *Dalbergia miscolobium*, onde indivíduos com mais de uma raiz pivotante foram descritos (Scholz *et al.* 2002). Embora nas plântulas germinadas *in vitro* não tenha sido observada a presença de mais de uma raiz pivotante, estudos sobre a ontogenia de plântulas e plantas jovens de *J. ulei* em substrato poderão contribuir para elucidar estas variações pouco usuais.

## CONCLUSÕES

- A desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *J. ulei* recém coletadas foi eficiente em todas as matrizes;
- As plântulas se desenvolveram em ágar e água e produziram explantes vigorosos para serem utilizados na fase seguinte;
- A filotaxia da plântula é oposta desde o primeiro par de folhas, as quais são compostas pinadas;
- A indução e o alongamento dos brotos foram observados em todos os tratamentos com BAP e AIB (0,00; 0,01 e 0,05 mg.L<sup>-1</sup>) testados, inclusive no controle, durante todos os subcultivos realizados;
- O tratamento BAP/AIB 0,05/0,05 mg.L<sup>-1</sup> favoreceu simultaneamente as maiores médias de multiplicação (2 brotos por explante) e comprimento (3,5 cm) dos brotos;
- A diminuição das médias desses parâmetros no quarto subcultivo ocorreu em função da alteração nas condições de cultivo, em decorrência da transferência do Laboratório de cultura de tecidos para as novas instalações do Instituto de Ciências Biológicas;
- Em estufa, a porcentagem de enraizamento no 90<sup>o</sup> dia de cultivo foi de 79%, com a formação de raízes mais alongadas e conectadas ao sistema vascular do caule;
- Na fase de aclimatização em estufa, após 18 meses de cultivo, as porcentagens de sobrevivência foram elevadas, tanto nos brotos enraizados *ex vitro* (71%), quanto naqueles enraizados durante a fase de multiplicação (82%);

- Após 24 meses de cultivo *ex vitro*, as plantas aclimatizadas em casa de vegetação começam a produzir folhas bipinadas, como a planta adulta, e o sistema radicular apresenta estrutura subterrânea espessada e curvada, com brotações, formação característica de xilopódio.

## REFERÊNCIAS

- Abdelwahd, R.; Hakam, N.; Labhilili, M.; Udupa, S. M. (2008) Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology*, 7: 997-1002.
- Akbas, F. A.; Isikalan, C.; Kara, Y.; Basaran, D. (2004) The Comparison on the Proliferation of Lateral Buds of *Vitis vinifera* L. cv. Perle de Csaba during Different Periods of the Year in *in vitro* Conditions. *International Journal of Agriculture Biology*, 6: 328-330.
- Álvares, M. C.; Caldas, L. S. (2002) Crescimento, produção e variação somaclonal em bananeiras micropropagadas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37: 415-420.
- Andrade, M. W.; Queiroz Luz, J. M.; Lacerda, A. S.; Melo, P. R. A. (2000) Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). *Ciência e Agrotecnologia*, 24: 174-180.
- APG III (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *The Linnean Society of London*, 161: 105-121.
- Appezatto-da-Glória, B. (2003) Morfologia de sistemas subterrâneos: histórico e evolução do conhecimento no Brasil. Ed. Alexandre Sene Pinto, Ribeirão Preto, 80p.
- Appezatto-da-Glória, B.; Cury, G. (2011) Morpho-anatomical features of underground systems in six Asteraceae species from the Brazilian Cerrado. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 83: 981-991.
- Araújo Neto, J. C.; Aguiar, I. B.; Ferreira, V. M.; Paula, R. C. (2002) Caracterização morfológica de frutos e sementes e desenvolvimento pós-seminal de monjoleiro (*Acacia polyphylla* DC.). *Revista Brasileira de Sementes*, 24: 203-211.
- Arelló, E. F.; Pinto, J. E. P. (1993) Propagação *in vitro* de *Kielmeyera coriacea* L. Efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenacético na multiplicação de brotos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 28: 25-31.

- Arruda, A. L. A.; Vieira, C. J. B.; Sousa, D. G.; Oliveira, R. F.; Castilho, R. O. (2011) *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Bignoniaceae) as an Antibacterial Agent. *Journal of medicinal food*, 14, 1604–1608.
- Assis, T. F.; Teixeira, S. L. (1998) Enraizamento de plantas lenhosas. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, v.1, p.261-296.
- Barbosa, G. F. (2010) Plantas medicinais: alternativa econômica a conservação do cerrado brasileiro? Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento Regional e Agronegócio, Universidade Federal do Tocantins, TO, 94p.
- Barros, M. (1981) Plantas medicinais, usos e tradições em Brasília – DF. *Anais do VII Simpósio de Plantas Mediciniais*. Oréades, 140-151.
- Barroso, G. M.; Morim, M. P.; Peixoto, A. L.; Ichaso, C. L. F. (1999) Frutos e Sementes. *Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas*. Viçosa, Editora UFV, 443p.
- Barroso, G. M.; Peixoto, A. L.; Ichaso, C. L. F.; Costa, C. G.; Guimarães, E. F.; Lima, H. C. (1991) *Sistemática de angiospermas do Brasil*. v.3, 1ed. Viçosa: Editora UFV, 326p.
- Barrueto Cid, L. P.; Teixeira, J. B. (2010a) Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: a, L. P. C (Ed.). *Cultivo in vitro de plantas*. Embrapa Informações Tecnológicas, Brasília, DF, 15-49.
- Barrueto Cid, L. P.; Teixeira, J. B. (2010b) Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: Barrueto, L. P. C (Ed.). *Cultivo in vitro de plantas*. Embrapa Informações Tecnológicas, Brasília, DF, 51-66.
- Baskin, J. M.; Baskin, C. C. (2004) A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14: 1-16.
- Bertolucci, S. K. V.; Pinto, J. E. B. P.; Cardoso, M. G.; Gavilanes, M. L.; Santiago, E. J. A.; Lameira, O. A. (2000) Micropropagação de *Tournefortia cf paniculata* Cham. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 3: 43-49.
- Bertozzo, F.; Machado, I. S. (2010) Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, 34: 1477-1482.
- Bewley, J. D.; Black, M. (1994) *Seeds: physiology of development and germination*. 2ed. New York: Plenum Press.
- Billot, J. (1974) Anthocyanin pigment evolution in flowers of *Jacaranda*. *Physiologie vegetale*, 12: 189-198.

- Böttcher, K.; Zoglauer, K.; Göring, H. (1988) Induction and reversion of vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiology Plant*, 72: 560-564.
- Brienza-Jr, S.; Yared, J. A. G.; Jarvis, P. G. (1991) Agroforestry systems as an ecological approach in the Brazilian Amazon development. *Forest Ecology and Management*, Special issue. *Agroforestry: principles and practices*, 45: 319-323.
- Carvalho, A. T.; Santos-Andrade E. F. G.; Schlindwein, C. (2007) Baixo Sucesso Reprodutivo em *Anemopaema laev* (Bignoniaceae) no Parque Nacional do Carimbau. Pernambuco. *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 102-104.
- Carvalho, J. L. N.; Avanzi, J. C.; Silva, M. L. N.; Mello, C. R.; Cerri, C. E. P. (2010) Potencial de sequestro de carbono em diferentes biomas do Brasil. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34: 277-290.
- Castro, A. H. F.; Alvarenga, A. A.; Paiva, R.; Gomes, G. A. C. (2005) Propagação do murici (*Byrsonima verbascifolia*) por cultivo *in vitro* de embriões. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 1: 1-7.
- Castro, A. H. F.; Paiva, R.; Alvarenga, A. A.; Castro, E. M.; Vitor, S. M. M.; Fernandes, A. M. (2007) Cultivo *in vitro* e aspectos da anatomia foliar de Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville Fabaceae Papilionoideae]. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 3: 61-68.
- Chinnappan, R. S.; Ruthar, N.; Sethu, S. S. (2011) Rapid *in vitro* propagation of *Premna serratifolia*, a medicinally important declining shrub, Índia. *Conservation Evidence*, 8: 66-73.
- Coelho, A. F. S.; Siqueira, D. L.; Bruckner, C.; Oliveira, A. B.; Cardoso, A. A. (1998) Regeneração de plantas a partir do cultivo de óvulos de *Citrus reticulata* cv. Dancy. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 33: 29-35.
- Cohen, D. (1995) The culture medium. *Acta Horticulturae*, 393: 15-24.
- Correia, M. C. R.; Pinheiro, M. C. B.; Lima, H. A. (2005) Biologia floral e polinização de *Arrabidaea conjugata* (Vell.) Mart. (Bignoniaceae). *Acta Botânica Brasílica*, 19: 501-510.
- Costa, R. S.; Ortolani, F. A.; Môro, F. V.; Paula, R. C. (2011) Caracterização morfológica de folhas e flores de espécies de *Jacaranda* (Bignoniaceae) cultivadas em Jaboticabal - SP. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 1: 169-181.

- Cury, G. (2008) Sistemas subterrâneos de Asteraceae do Cerrado paulista: abordagens anatômica, ecológica e reprodutiva. Tese de Doutorado em Fisiologia e bioquímica de plantas. ESALQ/USP-Piracicaba, 95p.
- Das, Premananda (2011) Somatic embryogenesis in four tree legumes. *Biotechnology Research International*, 1: 1-8.
- Dayal, R.; Seshadri, T. R. (1979) Chemical constituents of *Jacaranda mimosoefolia* wood. *Journal of the Indian Chemical Society*, 56: 1269-1270.
- Debergh, P. C.; Maene, L. V. (1981) A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, 14: 335-345.
- Dhiraj, N.; Vartak. V.; Bhargava, S. (2003) Provenance- and subculture-dependent variation during micropropagation of *Gmelina arborea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73: 189-195.
- Eymar, E.; Alegre, J.; Toribio, M.; López-Vela, D. (2000) Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63: 57-65.
- Fadel, D.; Kintzios, S.; Economou, A. S.; Moschopoulou, G.; Constantinidou, H-I. A. (2010) Effect of different strength of medium on organogenesis, phenolic accumulation and antioxidant activity of Spearmint (*Mentha spicata* L.). *The Open Horticulture Journal*, 3: 31-35.
- Farias, R.; Alves, E. R.; Martins, C. R; Barboza, M. A.; Godoy-Zanenga, R.; Silva, J. B.; Rodrigues-da-Silva, R. (2002) Caminhando pelo Cerrado, plantas herbáceo-arbustivas: caracteres vegetativos e organolépticos. Brasília: Ed. Universidade de Brasília, 94p.
- Farrant, J. M.; Pammenter, N. W.; Berjak, P. (1988) Recalcitrance: a current assessment. *Seed Science and Technology*, 16: 155-166.
- Ferguson, N. M.; Lien, E. J. J. (1982) A flavonol neohesperidoise from *Jacaranda acutifolia*. *Journal of Natural Products*, 45: 523-524.
- Fermino-Jr, P. C. P.; Raposo, A.; Scherwinski-Pereira, J. E. (2011) Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de *Tectona grandis*. *Floresta*, 4: 79-86.
- Fernandes, M. E. (1968) Anthocyanins in flowers of *Jacaranda mimosoefolia* D. Don and *Jacaranda semiserrata* Cham. *Anales de la Asociacion Química Argentina*, 56: 135-137.
- Ferreira, D. F. (2008) SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Científica Symposium*, Lavras, 6: 36-41.

- Ferreira, M. E.; Caldas, L. S.; Pereira, E. A. (1998) Aplicação da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Eds). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v.1, p.21-43.
- França, S. C.; Duarte, I. B.; Moraes, R.; Pereira, A. M. S. (1995) Micropropagation of *Stryphnodendron polyphythum* (barbatimão). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 45: 291-293.
- Fonseca, S. C. L.; Freire, H. B. (2003) Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. Bragantia, 62: 297-303.
- Frankie, G. W.; Haber, W. A.; Opler, P. A.; Bawa, K. S. (1983) Characteristics and organization of the large bee pollination system in the Costa Rican dry forest. In: Jone, C. E.; Little, R. J. (eds). Handbook of experimental pollination biology. New York Scientific and academic Editions, p.411-417.
- Freitas-Neto, O. G. (2009) Micropropagação e anatomia foliar de canela-de-ema (*Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. f. - Velloziaceae) em diferentes condições ambientais. Dissertação de Mestrado em Botânica. Universidade de Brasília, DF, 72p.
- Fukuda, W. S.; Silveira, C. E. S.; Pereira, L. A. R.; Soares e Silva, L. H. (2009) Multibrotação *in vitro* de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae). In: 60º Congresso Nacional de Botânica, 28 de junho a 03 de julho, Feira de Santana, BA. CD ROM.
- Gachet, M. S.; Schühly, W. (2009) Jacaranda - An ethnopharmacological and phytochemical review. Journal of Ethnopharmacology, 121: 14-27.
- Gamborg, O. L.; Miller, R. A.; Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151-158.
- Garcia, R.; Cidade, D.; Castellar, A.; Lips, A.; Magioli, C.; Callado, C.; Mansur, E. (2007) *In vitro* morphogenesis patterns from shoot apices of sugar cane are determined by light and type of growth regulator. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 90: 181-190.
- Garcia, R.; Pacheco, G.; Falcão, E.; Borges, G.; Mansur, E. (2011) Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 106: 47-54.



- Gemaque, R. C. R.; Davide, A. C.; Faria, J. M. R. (2002) Indicadores de maturidade fisiológica de sementes de Ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). *Cerne*, 8: 84-91.
- Gentry, A. H. (1974) Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Biotropica*, 6: 64-68.
- Gentry, A. H. (1979) Bignoniaceae of Southern Central América: Distribution and ecological specificity. *Biotropica*, 8: 117-131.
- Gentry, A. H. (1980) Bignoniaceae. Part I (Crescentiae and Tourrettieae). *Flora Neotropica. Monograph. v.25. The New York Botanical Gardens*, 130p.
- Gentry, A. H. (1990) Evolutionary patterns in Neotropical Bignoniaceae. *Memoirs of the New York Botanical Gardens*, p.118-129.
- George, E. F. (2008) Plant tissue culture procedure - background. In: George, E. F.; Hall, A. M.; De Klerk, G.-J. (Eds.). *Plant propagation by tissue culture: the background. 3.ed. Dordrecht: Springer, v.1, p.1-28.*
- George, E. F.; Debergh, P. C. (2008). *Micropropagation: uses and methods (2008).* In: George, E. F.; Hall, A. M.; De Klerk, G.-J. (Eds.). *Plant propagation by tissue culture: the background. 3.ed. Dordrecht: Springer, v.1, p.29-64.*
- Giri, C. C.; Shyamkumar, B.; Anjaneyulu, C. (2004) Progress in tissue culture, genetic transformation and application of biotechnology to trees: an overview. *Trees*, 18: 115-135.
- Grattapaglia, D.; Machado, M. A. (1998) Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v.1, p.183-260.*
- Grigoletto, E. R. 1997. *Micropropagação de Hancornia speciosa Gomez (Mangabeira). Tese de mestrado em Botânica da Universidade de Brasília, Brasília-DF, 68p.*
- Grigoletto, E. R.; Silveira, C. E.; Caldas, L. S. (1996) Micropropagação de mangaba (*H. speciosa* Gomez). *Anais do XLVII Nacional de Botânica, Nova Friburgo, RJ, p.441.*
- Gonçalves, D. J. P.; Pires, P. R. O.; Miguel, V. B.; Ribeiro, P. G. G. (2009) Biologia reprodutiva e morfologia floral de *Pyrostegia venusta* (Bignoniaceae) no campus da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. *Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil, 13-17 de setembro. São Lourenço, MG, p.1-3.*

- Hackett, W. P. (1988) Donnor plant maturation. In: Davies, T. D.; Haissig, B. E. (Ed.). Adventitious root formation in cuttings. Portland: Dioscorides Press, p.11-28.
- Hartmann, H. T.; Kester, D. E. (1984) Plant propagation. Principles and Practices. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 647p.
- Hartmann, H. T.; Kester, D. E.; Davies Junior, F. T.; Geneve, R. L. (2002) Plant propagation: principles and practices. 7ed. New Jersey: Prentice Hall, 880p.
- Hayashi, A. H. (2003) Morfo-anatomia de sistemas subterrâneos de espécies herbáceo-subarborescentes e arbóreas, enfatizando a origem das gemas caulinares. Tese Doutorado em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, SP.
- Hazarika, B. N. (2006) Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. Scientia Horticulturae, 108: 105-120.
- Hazra, S.; Sathaye, S. S.; Mascarenhas, A. F. (1989) Direct somatic embryogenesis in peanut (*Arachis Hypogaea*). Nature Biotechnology, 7: 949-951.
- Hironaka, G. M. F. N. (2000). O extrativismo como atividade agrária. Jus Navigandi, Teresina, ano 4, n. 42, jun. 2000. Disponível em: <<http://jus2.uol.com.br/doutrina/texto.asp?id=1667>>. Acesso em: 25 set. 2007.
- Hoffman W. A. (1998) Post-burn reproduction of woody plants in a neotropical savanna: the relative importance of sexual and vegetative reproduction. Journal of Applied Ecology, 35: 422-433.
- Hogan, D. J.; Cunha, J. M. P.; Carmo, R. L. (2002) Uso do solo e mudança de sua cobertura no centro-oeste do Brasil: conseqüências demográficas, sociais e ambientais. In: Hogan, D. J.; Carmo, R. L.; Cunha, J. M. P.; Baeninger, R. (org.). Migração e ambiente no Centro-Oeste. Campinas, NEPO/UNICAMP: PRONEX, p.149-174.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2010) IDS, Índice de desenvolvimento Sustentável, 2010: país evolui em indicadores de sustentabilidade, mas ainda há desigualdades socio econômicas e impactos ao meio ambiente. Comunicação Social 01 de setembro. [www.ibge.gov.br/home/presidencia/.../noticia\\_visualiza.php?ids2010](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/.../noticia_visualiza.php?ids2010). Acesso em 20/02/2012.
- Iriondo, J.M.; Moreno, C.; Pérez, C. (1995) Micropropagation of six rockrose (*Cistus*) species. HortScience, 30: 1080-1081.

- Johansen, D. A. (1940) Plant microtechnique. McGraw-hill Book Company Inc., New York.
- Joly, A. B. (1983) Botânica - Introdução à Taxonomia Vegetal. Cia Editora Nacional 6ed. São Paulo, 777p.
- Klein, V. A.; Siota, T. A.; Anesi, A. L.; Barboza, R. (2000) Propriedades físico-hídricas de substratos hortícolas comerciais. Revista brasileira de Agrociências, 6: 218-221.
- Klink, C. A. (1996) Relação entre o desenvolvimento agrícola e a biodiversidade. In: Pereira, R. C.; Nasser, L. C. B. (Eds.). Anais VIII Simpósio sobre o Cerrado, 1<sup>st</sup> International Symposium on Tropical Savanas - Biodiversidade e Produção Sustentável de Alimentos e fibras nos Cerrados. Embrapa CPAC. Brasília, p.25-27.
- Klink, C. A.; Machado, R. B. (2005) Conservation of the Brazilian Cerrado. Conservation Biology, 19: 707-713.
- Kowalski, B.; Staden, J. (2001) *In vitro* culture of two threatened South African medicinal trees – *Ocotea bullata* and *Warburgia salutaris*. Plant Growth Regulation, 34: 223-228.
- Krikorian, A. D.; O'Connor, S. A.; Fitter, M. S. (1983). Chromosome number variation and karyotype stability in cultures and culture-derived plants. In: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V.; Yamada, Y. (Eds). Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding., Collier MacMillan Publishing. New York , p.541-581.
- Labouriau, L. G. (1983) A germinação das sementes. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington, p.174.
- Lédo, A. S.; Seca, G. S. V.; Barboza, S. B. S. C.; Silva Junior, J. F. (2007) Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. Ciência e Agrotecnologia, 31: 989-993.
- Leite, G. L. D.; Veloso, R. V. S.; Castro, A. C. R.; Lopes, P. S. N.; Fernandes, G. W. (2007) Efeito do AIB sobre a qualidade e fitossanidade dos alporques de influência da *Caryocar brasiliense* Camb (CARYOCARACEAE). Revista Árvore, 31: 315-320.
- Lemos, E. E. P.; Blake, J. (1996) Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. Journal of Horticultural Science, 71: 395-403.
- Lloyd, G.; McCown, B. (1981) Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. HortScience, 15: 416-418.

- Lohmann, L. G. (2012) Bignoniaceae. In: Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB112305>).
- Lohmann, L. G.; Ulloa, C. U. (2007) Bignoniaceae in iPlants prototype checklist [online]. ([www.iplants.org](http://www.iplants.org)). Acesso em 15/08/2010.
- Lorenzi, H. (1992) Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2ed. Nova Odessa, SP; Editora Plantarum, v.1, p.37-41.
- Lorenzi, H. (1998) Árvores Brasileiras, I. Instituto Plantarum de Estudos de Flora Ltda. Ed. Nova Odessa, SP.
- Mantovani, N. C.; Franco, E. T. H.; Guerr, M. P.; Hoppe, J. M. (1999) Micropropagação de caixeta, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. Ciência Florestal, 9: 47-61.
- Mantovani, W.; Martins, F. R. (1988) Variações fenológicas das espécies de cerrado da reserva Biológica de Moji-Guaçú, São Paulo. Revista Brasileira de Botânica, 11: 101-112.
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2009) Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 399p.
- Marcondes, A. F.; Oliveira, M. A. (2011) Cerrado e etnoveterinária: o que se sabe em Jataí - GO? Revista Brasileira de Agroecologia, 6: 49-61.
- Martins, L. M.; Soares, A. M. P.; França, S. C.; Bertolini, B. W. (2011) Micropropagation and conservation of *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. *in vitro* germoplasm bank. Ciência Rural, 41: 454-458.
- Martins, M. B. G.; Castro, A. A.; Cavalheiro, A. J. (2008) Caracterização anatômica e química de folhas de *Jacaranda puberula* (Bignoniaceae) presente na Mata Atlântica. Revista Brasileira de Farmacognosia, 18: 600-607.
- Maruyama, E. (2003) *In vitro* propagation of *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don. Propagation of Ornamental Plants, 3: 27-33.
- Matsumoto, K. (2006) Cultura de Células em Suspensão – focalizando a bananeira. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa, p.24.
- Mattos, J. K. (1996) As Plantas Medicinais: Aspectos Agronômicos. Edição do autor, 51p.
- Melo, J. T.; Silvia, J. A.; Torres, R. A. A.; Silveira, C. E. S.; Caldas, L. S. (2008) Coleta, Propagação e Desenvolvimento Inicial de Espécies do Cerrado. In:

- Sano, S. M.; Almeida, S. P.; Ribeiro, J. F. (Eds). Cerrado: ecologia e flora. Embrapa Cerrados. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF, p.319-350.
- Mendonça, R. C.; Felfili, J. M.; Walter, B. M. T.; Silva Júnior, M. C.; Rezende, A. R.; Filgueiras, T. S.; Nogueira, P. E.; Fagg, C. W. (2008) Flora vascular do Bioma Cerrado. In: Sano, S. M.; Almeida, S. P.; Ribeiro, J. F.(Eds). Cerrado: ecologia e flora. Embrapa Cerrados. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF, 1279p.
- Mercier, H.; Vieira, C. C. J.; Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. (1992) Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a Brazilian medicinal plant. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 28: 249-254.
- Milanez, C. R. D.; Moraes-Dallaqua, M. A. (2003) Ontogênese do sistema subterrâneo de *Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi (Fabaceae). Revista Brasileira de Botânica, 26: 415-427.
- Mittermeier, R. A.; Gil, R. P.; Hoffman, M.; Pilgrim, J.; Brooks, T.; Mittermeier, C. G.; Lamoreux, J.; Fonseca, G. A. B. (2005) Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions, 2ed. University of Chicago Press, Boston.
- Mok, M. C.; Mok, D. W. S.; Armstrong, D. J.; Shudo, K.; Isogai, Y.; Okamoto, T. (1982) Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3,-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). Phytochemistry, 21: 1509-1511.
- Moreira, M. F.; Appezzato-da-Glória, B.; Zaidan, L. B. P. (2000) Anatomical aspects of IBA-treated microcuttings of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. Brazilian Archives of Biology and Technology, 43: 221-227.
- Murashige, T.; Skoog, F. A. (1962) A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Plant Physiology, 15: 473-479.
- Murashige, T. (1974) Plant propagation through tissue culture. Annual Review of Plant Physiology, 25: 135-166.
- Nicoli, P. M.; Paiva, R.; Nogueira, R. C.; Santana, J. R. F.; Silva C. L.; Silva, D. P. R.; Porto, J. M. P. (2008) Adjustment of the process of micropropagation of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. Ciência Rural, 38: 685-689.
- Noletto, L. G.; Ribeiro, M. F.; Silveira, C. E. (2003) Germinação *in vitro* de sementes de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae). In: 54º Nacional de Botânica, Belém: Relação de trabalhos. Belém: UNAMA. CD-ROM.

- Nunes, G. P.; Silva, M. F.; Resende, U. M.; Siqueira, J. M. (2003) Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13: 83-95.
- Ogura, M.; Cordell, G. A.; Farnsworth, N. R. (1976) Potential anticancer agents. III. Jacaranone, a novel phytoquinoid from *Jacaranda caucana*. *Lloydia*, 39: 255-257.
- Ogura, M.; Cordell, G. A.; Farnsworth, N. R. (1977a) Potential anticancer agents. IV. Constituents of *Jacaranda caucana* Pittier (Bignoniaceae). *Lloydia*, 40: 157-168.
- Ogura, M.; Cordell, G. A.; Farnsworth, N. R. (1977b). Jacoumaric acid, a new triterpene ester from *Jacaranda caucana*. *Phytochemistry*, 16: 286-287.
- Oliveira, D. (2001) Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de Phaseoleae, Sophoreae, Swartzieae e Tephrosieae. *Revista Brasileira de Botânica*, 24: 85-97.
- Oliveira, E. C. (1993) Morfologia de plântulas florestais. In: Aguiar, I. B.; Piña-Rodrigue, F. C. M.; Figliolia, M. B. (Eds). *Sementes florestais tropicais*. Abrates, Brasília, p.175-214.
- Oliveira, L. M.; Paiva, R.; Santana, J. R. F.; Pereira, F. D.; Nogueira, R. C.; Silva, L.C. (2010) Effects of cytokinins on *in vitro* mineral accumulation and bud development in *Annona glabra* L. *Ciência e Agrotecnologia*, 34: 1439-1445.
- Oliveira-Filho, A. T.; Ratter, J. A. (2002) Vegetation physiognomies and woody flora of the cerrado biome. In: Oliveira, P. S.; Marquis, R. J. (Eds). *The Cerrados of Brazil. Ecology an natural history of a Neotropical savanna*. Columbia University Press, New York, p.91-120.
- Oliveira, M. C.; Ribeiro, J. F., Silva Rios, M. N.; Rezende, M. E. (2001) Enraizamento de estacas para a produção de mudas de espécies nativas de matas de galeria. *Recomendação técnica 41*, Embrapa Cerrados, 4p.
- Olmstead, R. G.; Zjhra, M. L.; Lohmann, L. G.; Grose, S. O.; Eckert, A. J. (2009) A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. *American Journal of Botany*, 96: 1731-1743.
- Palhares, D.; Silveira, C. E. S. (2006) Morphology of stem and subterranean system of *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae). *Acta Botanica Hungarica*, 48: 89-101.

- Palhares, D.; Silveira, C. E. S. (2007) Aspectos morfológicos de plantas jovens de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae) produzidas em condições alternativas de cultivo. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 9: 93-96.
- Palhares, D.; Paula, J. E.; Pereira, L. A. R.; Silveira, C. E. S. (2007a) Comparative wood anatomy of stem, root and xylopodium of *Brosimum gaudichaudii* (Moraceae). *IAWA Journal*, 28: 83-84.
- Palhares, D.; Paula, J. E.; Pereira, L. A. R.; Silveira, C. E. S. (2007b) Comparative wood anatomy of bark of stems, roots and xylopodia of *Brosimum gaudichaudii* (Moraceae). *IAWA Journal*, 28: 315-324.
- Pan, M. J.; Staden, J. S. (1998) The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. *Plant Growth Regulation*, 26: 155-163.
- Pasqual, M.; Silva, A. B.; Maciel, A. L. R.; Pereira, A. B.; Alves, J. M. C. (2000) Enraizamento *in vitro* de um porta–enxerto de macieira em diversos substratos. *Scientia Agrícola*, 57: 81-784.
- Paviani, T. I. (1977) Estudo morfológico e anatômico de *Brasilia sickii* G. M. Barroso. II: Anatomia da raiz, do xilopódio e do caule. *Revista Brasileira de Biologia*, 37: 307-324.
- Peck, R. B.; Bishop, J. P. (1992) Management of secondary tree especies in Agroforestry systems to improve production sustainability in Amazonian Ecuador. *Agroforestry Systems*, 17: 53-63.
- Pereira de Sá, S. P. (1991) Micropropagação de *Dalbergia miscolobium* e *Dalbergia nigra*. In: I Encontro de Botânicos do Centro-Oeste. Brasília. Resumos. Planaltina: Embrapa - CPAC/UnB, p.47.
- Pereira, K. B. D. (2002) Micropropagação e estudo morfo-anatômico do endocarpo, semente e plântula de *Byrsonima basiloba* Juss. Dissertação de Mestrado em Botânica, Universidade de Brasília, DF, 151p.
- Peres, L. E. P.; Mercier, H.; Kerbauy, G. B.; Zaffari, G. R. (1997) Níveis endógenos de AIA, Citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinados por HPLC e ELISA. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 9: 169-176.
- Pérez-Gutiérrez, R. M.; Pérez-Gutiérrez, S.; Pérez-González, C. (1994) *In Vitro* susceptibility of pathogenic *Acanthamoeba castellanij* to *Jacaranda mimosaeifolia* extract. *Phyton*, 56: 39-41.

- Perrando, E. R.; Corder, M. P. M. (2006) Rebrotas de cepas de *Acacia mearnsii* em diferentes idades, épocas do ano e alturas de corte. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 41: 555-562.
- Pinto, J. E. B. P.; Arelo, E. F.; Pinto, A. C. B. P.; Barbosa, M. H. P. (1994) Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de *Kielmeyera coriacea*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 29: 867-873.
- Pinto, M. M.; Sader, R.; Barbosa, J. M. (1986) Influência do tempo de secagem e do armazenamento sobre a viabilidade das sementes de ipê-rosa. Revista Brasileira de Sementes, 8: 37-47.
- Pinheiro, C. S. R.; Medeiros, D. N.; Macedo, C. E. C.; Alloufa, M. A. I. (2001) Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. Revista Brasileira de Fruticultura, 23: 413-416.
- Pospíšilová, J.; Tichá, I.; Kadleček, P.; Haisel, D.; Plzánková, Š. (1999). Review - Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. Biologia Plantarum, 42: 481-497.
- Prakash, L.; Garg, G. (1980) Chemical examination of the root barks of *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don. e *Tabebuia pentaphyllia* (Linn). Hemsí Pharmazie, 35: 649-649.
- Preece, J. E.; Christ, P. H.; Ensenberger, L.; Zhao, J. L. (1987) Micropropagation of ash (*Fraxinus*). The international plant propagator's society. Combined Proceeding, 37: 366-373.
- Quoirin, M.; Lepoivre, P. (1977) Étude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. Acta Horticulturae, 78: 437-442.
- Quoirin, M.; Silva, M. C.; Martins, K. G.; Oliveira, D. E. (2001) Multiplication of juvenile black wattle (*Acacia mearnsii* de Wild) by microcuttings. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 66: 199-205.
- Rahmatullah, M.; Samarrai, W.; Jahan, R.; Rahman, S.; Sharmin, N.; Miajee, Z. U. M. E. U; Chowdhury, M. H.; Bari, S.; Jamal, F.; Bashar, A. B. M. A.; Azad, A. K.; Ahsan, S. (2010) An Ethnomedicinal, Pharmacological and Phytochemical Review of Some Bignoniaceae. Advances in Natural and Applied Sciences, 4: 236-253.
- Rajjou, L.; Duval, M.; Gallardo, K.; Catusse, J.; Bally, J.; Job, C.; Job, D. (2012) Seed Germination and Vigor. Annual Review of Plant Biology, 63: 507-533.



- Ratter, J. A. (1992) Transitions between cerrado and forest vegetation in Brasil. In: Furley, P. A.; Proctor, J.; Ratter, J. A. (Eds.). Nature and dynamics of forest savanna boundaries. London: Chapman & Hall, p.51-76.
- Reis, N. V. B. (2005) Construção de estufas para produção de hortaliças nas Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Embrapa, Circular técnica 38, 16p.
- Ribeiro, M. F. (2003) Biologia Reprodutiva e polinização de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae). Dissertação Mestrado em Botânica, Universidade de Brasília, DF, 196p.
- Ribeiro, J. F.; Bridgewater, S.; Ratter, J. A.; Sousa-Silva, J. C. (2005) Ocupação do bioma Cerrado e conservação da sua diversidade vegetal. In: Scariot, A.; Sousa-Silva, J. C.; Felfili, J. M. (Eds.). Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p.383-399.
- Ribeiro, J. F.; Walter, B. M. T. (2008) As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In: Sano, S. M.; Almeida, S. P.; Ribeiro, J. F. (Eds.). Cerrado: ecologia e flora. Embrapa Cerrados. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF, p.152-202.
- Riffaud, J. L.; Cornu, D. (1981) Utilisation de la culture *in vitro* pour la multiplication de merisiers adultes (*Prunus avium* L.) sélectionnés em forêt. Agronomie, 1: 633-640.
- Rizzini, C. T. (1963) O fator edáfico na formação do xilopódio de *Mimosa multipinna* Benth. Anais da Academia Brasileira de Ciências 35:75-77.
- Rizzini, C. T.; Heringer, E. P. (1961) Underground organs of plants from some southern Brazilian savannas, with special reference to the xylopodium. Phytion, 17: 105-124.
- Rizzini C. T.; Heringer E. P. (1966) Estudo sobre os sistemas subterrâneos difusos de plantas campestres. In: Simpósio sobre o Cerrado, 2. Rio de Janeiro. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 38(suplemento): 85-112.
- Roberts, E. H. (1973) Predicting the storage life of seeds. Seed Science and Technology, 1: 499-514.
- Rocha, M. A. C.; Costa, M. A. P. C.; Silva, S. A.; Lédo, C. A. S.; Moreira, M. J. S.; Bastos, L. P. (2008) Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). Revista Brasileira de Fruticultura, 30: 769-774.
- Rodrigues, V. E. G.; Carvalho, D. (2001) Plantas Medicinais no domínio dos Cerrados. Lavras: UFLA. p.49-144.

- Sano, E. E.; Rosa, R.; Brito, J. L. S.; Ferreira, L. G. (2010) Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 166: 113-124.
- Santos, B. R.; Paiva, R. ; Nogueira, R. C.; Oliveira, L. M.; Silva, D. P. C.; Martinotto, C.; Soares, F. P.; Paiva, P. D. O. (2006) Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28: 293-296.
- Santos, P. M. L.; Japp, A. S.; Lima, L. G.; Schripsema, J.; Menezes, F. S.; Kuster, R. M. (2010) Antioxidant activity from the leaf extracts of *Jacaranda puberula* Cham., Bignoniaceae, a Brazilian medicinal plant used for blood depuration. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20: 147-153.
- Sawyer, D.; Scardua, F.; Pinheiro, L. (1999) Extrativismo vegetal no Cerrado: análise de dados de produção, 1980-1993. Brasília: ISPN/CMBBC. 9p.
- Sawyer, D. (2002). População, meio ambiente e desenvolvimento sustentável no cerrado. In: Hogan, D. J.; Carmo, R. L.; Cunha, J. M. P.; Baeninger, R. (Eds.). *Migração e ambiente no Centro-Oeste*. Campinas, NEPO/UNICAMP: PRONEX, p.279-299.
- Schifino-Wittmann, M. T., Dall'Agnol, M. (2002) Auto-incompatibilidade em plantas. *Ciência Rural*, 32: 1083-1090.
- Scholz, F. G.; Bucci, S. J.; Goldstein, G.; Meinzer, F. C.; Franco, A. C. (2002) Hydraulic redistribution of soil water by neotropical savanna trees. *Tree Physiology*, 22: 603-612.
- Silva, C. S. P.; Proença, C. E. B. (2008) Uso e disponibilidade de recursos medicinais no município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil. *Acta Botanica Brasílica*, 22: 481-492.
- Silva, F. A. B.; Pereira, L. A. R.; Silveira, C. E. S. (2008) *In vitro* micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. (Quince). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51: 1103-1114.
- Silva, I. A.; Valenti, M. W.; Silva-Matos, D. M. (2009) Efeitos do fogo na estrutura da população de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (Rutaceae) em uma savana brasileira. *Brazilian Journal of Biology*, 69: 813-818.
- Silva, J. F.; Fariñas, M. R.; Felfili, J. M.; Klink, C. A. (2006) Spatial heterogeneity, land use and conservation in the cerrado region of Brazil. *Journal of Biogeography*, 33: 536–548.
- Silva, P. R. D.; Silveira, C. E. S.; Noletto, L. G. (2005) Efeito do ácido giberélico (GA3) na germinação de sementes de *jacaranda ulei* Bureau & Schum.

- (Bignoniaceae). In: 56<sup>o</sup> Congresso Nacional de Botânica, 09 a 14 outubro, Curitiba, PR. CD-ROM.
- Silva Rios M. N.; Ribeiro J. F.; Rezende M. E. (2001) Propagação Vegetativa: enraizamento em estacas de espécies nativas de Mata de Galeria. In: Cerrado, Caracterização e Recuperação de Matas de Galeria, Embrapa. 899p.
- Silva, R. P.; Peixoto, J. R.; Junqueira, N. T. V. (2001) Influência de diversos substratos no desenvolvimento de mudas de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* DEG). Revista Brasileira de Fruticultura, 23: 377-381.
- Silveira, C. E. (1994) Bouturage et microbouturage du *Fraxinus excelsior* L.: aspects morphogenetiques et cytophysiologiques. Tese de doutorado em morfo-anatomia e fisiologia vegetal. Universidade Pierre et Marie Curie, Paris VI. Paris, 301p.
- Silveira, C. E. S.; Andrade, L. R. M.; Miranda, Z. G.; Franco, I. A.; Santos, F. V.; Vieira, P. R.; Lima, M. R.; Pereira, L. A. R. (2010) Propagação clássica e *in vitro* de espécies nativas do cerrado tolerantes a metais. In: 2<sup>o</sup> Workshop sobre Relações entre metais do solo e a biodiversidade no Cerrado: ferramentas para a conservação ambiental e a recuperação de áreas degradadas. Brasília. Embrapa Cerrados, 1: 107-122.
- Silveira, C. E.; Cottignies, A. (1994) Period of harvest, sprouting ability of cutting, and *in vitro* plant regeneration in *Fraxinus excelsior*. Canadian Journal of Botany, 72: 261-267.
- Silveira, C. E. S.; Palhares, D.; Pereira, L. A. R.; Pereira, K. B. D.; Silva, F. A. B. (2012) Strategies of plant establishment of two Cerrado species: *Byrsonima basiloba* Juss. (Malpighiaceae) and *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC (Myrtaceae). Plant Species Biology, In Press.
- Singh, R. B. (1997) Polysaccharide from *Jacaranda mimosaeifolia* seeds. Asian Journal of Chemistry 9: 162-165.
- Soares, F. P.; Paiva, R.; Alvarenga, A. A.; Nery, F. C.; Vargas, D. P.; Silva, D. R. G. (2011) Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. Ciência e Agrotecnologia, 35: 152-157.
- Socolowski, F.; Takaki, M. (2004) Germination of *Jacaranda mimosifolia* (D. Don - Bignoniaceae) seeds: effects of light, temperature and water stress. Brazilian Archives of Biology and Technology, 47: 785-792.

- Sotelo, M.; Monza, J. (2007) Micropropagation of *Eucalyptus maidenii* elite trees. *Agrociência*, 11: 81-89.
- Souza A. V.; Bertoni B. W.; França S. C.; Pereira A. M. S. (2009) Otimização de protocolo para o enraizamento *in vitro* de Jalapa (*Mandevilla illustris*) (Vell.) R. E. Woodson. *Horticultura Brasileira*, 27: 1124-1130.
- Souza, J. A.; Schuch, M. W.; Silva, L. C (2006) Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta matriz no estabelecimento *in vitro* de araçazeiro cv. "Irapuã". *Ciência Rural*, 36: 1920-1922.
- Spangler, R. E.; Olmstead, R. G. (1999) Phylogenetic analysis of Bignoniaceae based on the cpDNA gene sequences *rbcL* and *ndhF*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 86: 33-46.
- Srivastava, N.; Kamal, B.; Sharma, V.; Negi, Y. K.; Dobriyal, A. K.; Gupta, S.; Jadon, V. S. (2010) Standardization of sterilization protocol for micropropagation of *Aconitum heterophyllum*: An endangered medicinal herb. *Academia Arena*, 2: 37-42.
- Srivastava, N.; Sharma, V.; Dobriyal, A. K.; Kamal, B.; Gupta, S.; Jadon, V. S. (2011) Influence of Pre-Sowing Treatments on *in vitro* Seed Germination of Ativisha (*Aconitum heterophyllum* Wall) of Uttarakhand. *Biotechnology*, 10, 215-219.
- Staden, J.; Zazimalova, E.; George, E. F. (2008) Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In: George, E. F.; Hall, A. M.; De Klerk, G.-J. (Eds.). *Plant propagation by tissue culture: the background*. 3.ed. Dordrecht: Springer, . v.1, p.205-226.
- Subraman, S. S.; Nágaraja, S.; Sulochan, N. (1973) Hydroquinone from leaves of *Jacaranda mimosaeifolia*. *Phytochemistry*, 12: 220-221.
- Teixeira, J. B. (2001) Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Brasília: Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- Teixeira, J. B.; Cruz, A. R. R.; Ferreira, F. R.; Cabral, J. R. (2001) Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. *Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento*, 3: 42-47.
- Thorpe, T. A. (1993) *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and biochemical aspects. In: Roubelakis-Angelakis, K. A.; Tran Thank Van, K. (Eds.). *Morphogenesis in plant*. New York: Plenum Press, p.19-38.

- Valdés, A. E.; Ordás, R. J.; Fernández, B.; Centeno, M. L. (2001) Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39: 377-384.
- Vidal, M. C.; Seraphin, E. S.; Câmara, H. H. L. L. (1999) Crescimento de plântulas de *Solanum lycocarpum* St. Hil (Lobeira) em casa de vegetação. *Acta Botânica Brasilica*, 13: 271-274.
- Vilhalva, D. A. A.; Appezzato-da-Glória, B. (2006) Morfo-anatomia do sistema subterrâneo de *Calea verticillata* (Klatt) Pruski e *Isostigma megapotamicum* (Spreng.) Sherff - Asteraceae. *Revista Brasileira de Botânica*, 29: 39-47.
- Wendling, I.; Dutra, L. F.; Hoffmann, H. A.; Bettio, G.; Hansel, F. (2009) Indução de brotações epicórmicas ortotrópicas para a propagação vegetativa de árvores adultas de *Araucaria angustifolia*. *Agronomía Costarricense*, 33: 309-319.
- Weninger, B.; Robledo, S.; Arango, G.J.; Deharo, E.; Aragón, R.; Muñoz, V.; Callapa, J.; Lobstein, A.; Anton, R. (2001) Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, 78: 193-200.
- Wetzel, M. M. V. S. (1997) Época de dispersão e fisiologia de sementes do cerrado. Tese de Doutorado em Ecologia. Universidade de Brasília- DF, 171p.
- Xing, W; Bao, M.; Qin, H.; Ning, G. (2010) Micropropagation of *rosa rugosa* through axillary shoot proliferation. *Acta Biologica Cracoviensia*, 52: 69-75.

## ANEXOS

### GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA PLÂNTULA

Anexo 1. Análise de variância da **germinabilidade** *in vitro*, no 30<sup>o</sup> dia de cultivo, nas diferentes matrizes de *Jacaranda ulei*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MATRIZ	4	3.365000	0.841250	12.744	0.0000
erro	395	26.075000	0.066013		
Total corrigido	399	29.440000			
CV (%) =	27.93				
Média geral:	0.9200000	Número de observações:	400		

Anexo 2. Análise de variância das **plântulas normais** (%), desenvolvidas *in vitro*, no 60<sup>o</sup> dia de cultivo, nas diferentes matrizes de *Jacaranda ulei*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
MATRIZ	4	0.047625	0.011906	0.162	0.9574
erro	363	26.667049	0.073463		
Total corrigido	367	26.714674			
CV (%) =	29.42				
Média geral:	0.9211957	Número de observações:	368		

Anexo 3. Análise de variância da **germinabilidade** *in vitro*, no 30<sup>o</sup> dia de cultivo, em sementes *Jacaranda ulei*, **armazenadas** por 6 meses e 12 meses.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ARMAZENAME	1	0.843750	0.843750	3.622	0.0601
erro	94	21.895833	0.232934		
Total corrigido	95	22.739583			
CV (%) =	125.22				
Média geral:	0.3854167	Número de observações:	96		

## MULTIPLICAÇÃO E SUBCULTIVOS

Anexo 4. Análise de variância do **número de brotos** formados em *Jacaranda ulei* durante a fase de multiplicação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BAP	2	9.957002	4.978501	3.965	0.0193
AIB	2	2.361605	1.180803	0.940	0.3909
SUB	3	51.300990	17.100330	13.619	0.0000
BAP*AIB	4	23.930415	5.982604	4.765	0.0008
BAP*SUB	6	32.126923	5.354487	4.265	0.0003
AIB*SUB	6	9.072330	1.512055	1.204	0.3017
BAP*AIB*SUB	12	24.168402	2.014033	1.604	0.0850
erro	865	1086.083442	1.255588		
Total corrigido	900	1239.001110			
CV (%) =	64.72				
Média geral:	1.7314095	Número de observações:	901		

Anexo 5. Análise de variância do **comprimento (cm)** de brotos formados em *Jacaranda ulei* durante a fase de multiplicação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BAP	2	29.581764	14.790882	19.689	0.0000
AIB	2	7.571190	3.785595	5.039	0.0067
SUB	3	147.032486	49.010829	65.240	0.0000
BAP*AIB	4	29.758595	7.439649	9.903	0.0000
BAP*SUB	6	6.649290	1.108215	1.475	0.1836
AIB*SUB	6	34.037846	5.672974	7.552	0.0000
BAP*AIB*SUB	12	20.087983	1.673999	2.228	0.0092
erro	865	649.818027	0.751235		
Total corrigido	900	924.537181			
CV (%) =	50.03				
Média geral:	1.7325194	Número de observações:	901		

## ENRAIZAMENTO EM MEIO COM E SEM CARVÃO ATIVADO

Anexo 6. Análise de variância do **enraizamento** (%) dos brotos de *Jacaranda ulei in vitro*, cultivada em ¼ MS, com ou sem carvão ativado, no 90<sup>o</sup> dia de cultivo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	5.333333	5.333333	46.000	0.0000
erro	46	5.333333	0.115942		
Total corrigido	47	10.666667			
CV (%) =	102.15				
Média geral:	0.3333333	Número de observações:		48	

Anexo 7. Análise de variância da **necrose do ápice** (%) da parte aérea dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., durante o enraizamento, em meio ¼ MS com ou sem carvão ativado, no 90<sup>o</sup> dia de cultivo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	1.020833	1.020833	9.471	0.0035
erro	46	4.958333	0.107790		
Total corrigido	47	5.979167			
CV (%) =	38.44				
Média geral:	0.8541667	Número de observações:		48	

Anexo 8. Análise de variância da formação de **nova brotação** (%) da parte aérea dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., durante o enraizamento, em meio ¼ MS com ou sem carvão ativado, no 90<sup>o</sup> dia de cultivo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	6.750000	6.750000	69.000	0.0000
erro	46	4.500000	0.097826		
Total corrigido	47	11.250000			
CV (%) =	83.41				
Média geral:	0.3750000	Número de observações:		48	



## ENRAIZAMENTO DURANTE A FASE DE MULTIPLICAÇÃO

Anexo 9. Análise de variância do **enraizamento (%)** em *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., durante a fase de multiplicação *in vitro*, em todos os tratamentos com BAP/AIB, do 6º subcultivo, no 90º dia de cultivo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	8	9.610967	1.201371	7.537	0.0000
erro	273	43.513146	0.159389		
Total corrigido	281	53.124113			
CV (%) =	158.57				
Média geral:	0.2517730	Número de observações:		282	

Anexo 10. Análise de variância do **número de raízes** em *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., formadas durante a fase de multiplicação *in vitro*, em todos os tratamentos com BAP/AIB, do 6º subcultivo, no 90º dia de cultivo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	8	25.308707	3.163588	1.425	0.2041
erro	62	137.649039	2.220146		
Total corrigido	70	162.957746			
CV (%) =	62.23				
Média geral:	2.3943662	Número de observações:		71	

Anexo 11. Análise de variância da **sobrevivência (%)** de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., durante a fase de multiplicação *in vitro*, em todos os tratamentos com BAP/AIB, do 6º subcultivo, no 90º dia de cultivo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAM	8	0.110816	0.013852	2.017	0.0446
erro	273	1.875000	0.006868		
Total corrigido	281	1.985816			
CV (%) =	8.35				
Média geral:	0.9929078	Número de observações:		282	

Anexo 12. Análise de variância da **necrose do ápice** (%) da parte aérea dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., durante a fase de multiplicação *in vitro*, em todos os tratamentos com BAP/AIB, do 6º subcultivo, no 90º dia de cultivo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	8	6.148519	0.768565	4.467	0.0000
erro	273	46.975595	0.172072		
Total corrigido	281	53.124113			
CV (%) =	164.76				
Média geral:	0.2517730	Número de observações:		282	

## ENRAIZAMENTO: COMPARAÇÃO EM 3 DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

Anexo 13. Análise de variância do **enraizamento** (%) dos brotos de *Jacaranda ulei*, em diferentes condições: *in vitro* (meio sem carvão), *ex vitro* (estufa) e durante a fase de multiplicação (BAP/AIB 0,0/0,0; 0,00/0,01 e 0,01/0,01 mg.L<sup>-1</sup>), 90º dia de cultivo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAM	4	3.796593	0.949148	4.322	0.0024
erro	157	34.475012	0.219586		
Total corrigido	161	38.271605			
CV (%) =	75.91				
Média geral:	0.6172840	Número de observações:		162	

Anexo 14. Análise de variância do **número de raízes** por broto, em *Jacaranda ulei*, em diferentes condições: *in vitro* (meio sem carvão), *ex vitro* (estufa) e durante a fase de multiplicação (BAP/AIB 0,0/0,0; 0,00/0,01 e 0,01/0,01 mg.L<sup>-1</sup>), 90º dia de cultivo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAM	4	9.143414	2.285854	1.176	0.3263
erro	95	184.646586	1.943648		
Total corrigido	99	193.790000			
CV (%) =	58.33				
Média geral:	2.3900000	Número de observações:		100	

Anexo 15. Análise de variância do **comprimento da maior raiz** de cada broto, em *Jacaranda ulei*, cultivada em diferentes condições: *in vitro* (meio sem carvão), *ex vitro* (estufa) e durante a fase de multiplicação (BAP/AIB 0,0/0,0; 0,00/0,01 e 0,01/0,01 mg.L<sup>-1</sup>), 90<sup>o</sup> dia de cultivo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAM	4	271.747067	67.936767	9.696	0.0000
erro	95	665.642933	7.006768		
Total corrigido	99	937.390000			
CV (%) =	94.20				
Média geral:	2.8100000	Número de observações:		100	

Anexo 16. Análise de variância dos **brotos com raiz lateral (%)**, em *Jacaranda ulei*, cultivada em diferentes condições: *in vitro* (meio sem carvão), *ex vitro* (estufa) e durante a fase de multiplicação (BAP/AIB 0,0/0,0; 0,00/0,01 e 0,01/0,01 mg.L<sup>-1</sup>), 90<sup>o</sup> dia de cultivo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAM	4	2.820488	0.705122	7.266	0.0000
erro	95	9.219512	0.097047		
Total corrigido	99	12.040000			
CV (%) =	222.52				
Média geral:	0.1400000	Número de observações:		100	

Anexo 17. Análise de variância dos brotos com pelo menos uma **raiz maior do que 1 cm**, em *Jacaranda ulei*, cultivada em diferentes condições: *in vitro* (meio sem carvão), *ex vitro* (estufa) e durante a fase de multiplicação (BAP/AIB 0,0/0,0; 0,00/0,01 e 0,01/0,01 mg.L<sup>-1</sup>), 90<sup>o</sup> dia de cultivo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAM	4	7.551925	1.887981	10.671	0.0000
erro	95	16.808075	0.176927		
Total corrigido	99	24.360000			
CV (%) =	72.52				
Média geral:	0.5800000	Número de observações:		100	

Anexo 18. Análise de variância do **comprimento da maior acima de 1 cm** de cada broto, em diferentes condições: *in vitro* (meio sem carvão), *ex vitro* (estufa) e durante a fase de multiplicação (BAP/AIB 0,0/0,0; 0,00/0,01 e 0,01/0,01 mg.L<sup>-1</sup>), 90<sup>o</sup> dia de cultivo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAM	4	58.399814	14.599953	1.536	0.2052
erro	53	503.824324	9.506119		
Total corrigido	57	562.224138			
CV (%) =	69.58				
Média geral:	4.4310345	Número de observações:		58	

Anexo 19. Análise de variância da **sobrevivência (%)** de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., em diferentes condições: *in vitro* (meio sem carvão), *ex vitro* (estufa) e durante a fase de multiplicação (BAP/AIB 0,0/0,0; 0,00/0,01 e 0,01/0,01 mg.L<sup>-1</sup>), 90<sup>o</sup> dia de cultivo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAM	4	0.013397	0.003349	0.533	0.7117
erro	156	0.980392	0.006285		
Total corrigido	160	0.993789			
CV (%) =	7.98				
Média geral:	0.9937888	Número de observações:		161	

Anexo 20. Análise de variância da **necrose do ápice (%)** da parte aérea dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., em diferentes condições: *in vitro* (meio sem carvão), *ex vitro* (estufa) e durante a fase de multiplicação (BAP/AIB 0,0/0,0; 0,00/0,01 e 0,01/0,01 mg.L<sup>-1</sup>), 90<sup>o</sup> dia de cultivo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAM	4	11.060913	2.765228	23.328	0.0000
erro	156	18.491882	0.118538		
Total corrigido	160	29.552795			
CV (%) =	142.13				
Média geral:	0.2422360	Número de observações:		161	

Anexo 21. Análise de variância formação de **nova brotação** (%) da parte aérea dos brotos de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum., em diferentes condições: *in vitro* (meio sem carvão) e *ex vitro* (estufa), 90<sup>o</sup> dia de cultivo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAM	1	7.796471	7.796471	77.714	0.0000
erro	73	7.323529	0.100322		
Total corrigido	74	15.120000			
CV (%) =	113.12				
Média geral:	0.2800000	Número de observações:	75		