ESTUDOS CITOLÓGICOS EM AMOREIRA,
Morus alba L.

TAMARA CANTO FONSECA
(Engenheira Agrônoma)

Orientador: Prof. Dr. GERHARD BANDEL

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de doutor em Agronomia, Área de
Concentração : Genética e Melhoramento de
Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
outubro/1997

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Fonseca, Tamara Canto

Estudos citológicos em amoreira, *Morus alba* L. / Tamara Canto Fonseca. - -
Piracicaba, 1997.

104 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.

Bibliografia.

1. Amora 2. Citologia 3. Melhoramento 4. Sericicultura I. Título

CDD 634.38
638.2

ESTUDOS CITOLÓGICOS EM AMOREIRA,
***Morus alba* L**

TAMARA CANTO FONSECA

Aprovada em: 29.10.1987

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Gerhard Bandel	ESALQ/USP
Prof ^a . Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira	ESALQ/USP
Prof. Dr. Luiz Carlos Marchini	ESALQ/USP
Prof ^a . Dra. Maria Neysa Silva Stort	FBRC/UNESP
Prof ^a . Dra. Augusta Carolina de Camargo Carmelo Moreti	IZ/SAA

Prof. Dr. GERHARD BANDEL
Orientador

À meus pais

À GIGI e ao DUDU

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial:

- Ao Professor Dr. Gerhard Bandel, pela orientação e amizade constantes.
- À Professora Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira, por abrir o seu laboratório ao nosso trabalho, orientação e amizade.
- À colega Sílvia Marina Cuco, pelo valoroso auxílio na execução e análise do trabalho, obtenção das microfotografias e amizade inestimável.
- Aos Professores Dr. Geraldo Antônio Tosello e Dr. José Branco de Miranda Filho, na qualidade de chefes do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pelas facilidades concedidas.
- Aos professores do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pelos conhecimentos transmitidos.
- Ao Instituto de Zootecnia, pelas facilidades concedidas.
- A colega e diretora Dra. Augusta Carolina de Carmello Camargo Moreti pelas facilidades concedidas, amizade e apoio.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.
- A Carlos Alberto de Oliveira, pelo excelente auxílio durante a execução da parte experimental e pela amizade.
- Aos funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em especial a Antônio de Pádua Gorga (Oberdã) e Fernando Leopoldino.
- Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ/USP.
- À minha família pelo apoio e compreensão.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	06
2.1 Características botânicas da amoreira, <i>Morus alba</i> L..	06
2.2 Citologia.....	15
2.3 Micropropagação.....	20
2.3.1 Micropropagação da amoreira (<i>Morus spp</i>).....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Macrosporogênese e Microsporogênese de <i>Morus alba</i> L..	31
3.1.1 Medidas das inflorescências.....	37
3.2 Micropropagação.....	38
3.2.1 Material.....	38
3.2.2 Estabelecimento <i>in vitro</i>	38
3.3 Estudo de cromossomos mitóticos.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Morfologia Floral e Estrutura da Raiz.....	45
4.1.1 Morfologia Floral.....	45
4.1.1.1 A Flor Feminina.....	48
4.1.1.2 A Flor Masculina.....	51

4.1.2 Estrutura da Raiz	54
4.2 Gametogênese	57
4.2.1 Macrosporogênese	57
4.2.2 Microsporogênese	60
4.3 Micropropagação	69
4.4 Cromossomos mitóticos.	80
5 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	84
APÊNDICE	101
ABREVIATURAS	104

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Características do estilo da amoreira (<i>M.alba</i> L.), segundo Koidzume.	08
Figura 2	<i>Morus</i> spp classificadas pela presença ou ausência e comprimento de estilo segundo Koidzume.	10
Figura 3	Ramos dos clones Formosa, Catânia Paulista, e IZ56/4 (<i>M.alba</i> L.).	32
Figura 4	Ramos dos clones Calabresa e Nezumigaeshi (<i>M.alba</i> L.).	33
Figura 5	Ramos dos clones IZ15/1 e IZ15/7 (<i>M.alba</i> L.). ...	35
Figura 6	Vista parcial da parcela do clone IZ56/4 (<i>M.alba</i> L.).	39
Figura 7	Vista do canteiro de estacas do clone IZ56/4 (<i>M.alba</i> L.) em casa de vegetação.	41
Figura 8	Esquema típico da inflorescências masculinas e femininas da amoreira, <i>Morus</i> spp.	45

	Página
Figura 16 Corte transversal da flor feminina do clone IZ15/1 (<i>M.alba</i> L.). com CMGP em início de prófase I . . .	58
Figura 17 Cortes longitudinais do saco embrionário da flor feminina do clone IZ56/4, <i>M.alba</i> L.	59
Figura 18 Inflorescência masculina do clone Catânia Paulista, <i>M.alba</i> L.	61
Figura 19 a CMGP do clone IZ15/7, (<i>M.alba</i> L.) - leptóteno . . .	63
Figura 19 b CMGP do clone IZ15/7, (<i>M.alba</i> L.) - zigóteno. . . .	63
Figura 19 c CMGP do clone IZ15/7, (<i>M.alba</i> L.) - paquíteno. . .	63
Figura 19 d CMGP do clone IZ15/7, (<i>M.alba</i> L.) - diplóteno. . .	63
Figura 19 e CMGP do clone IZ15/7, (<i>M.alba</i> L.) - diacinese. . .	63
Figura 20 a CMGP do clone IZ15/7, (<i>M.alba</i> L.). - metáfase I - vista lateral.	66
Figura 20 b CMGP do clone IZ15/7, (<i>M.alba</i> L.). - início de anáfase I - vista lateral.	66
Figura 20 c CMGP do clone IZ15/7, (<i>M.alba</i> L.) - final de anáfase I - vista lateral.	66

	Página
Figura 20 d CMGP do clone IZ15/7, (<i>M.alba</i> L.) - final de anáfase I.	66
Figura 21 a CMGP do clone IZ15/7, (<i>M.alba</i> L.). - prófase II. ...	67
Figura 21 b CMGP do clone IZ15/7, (<i>M.alba</i> L.). - início de anáfase II.	67
Figura 21 c CMGP do clone IZ15/7, (<i>M.alba</i> L.). - final de anáfase II.	67
Figura 21 d Tétrades do clone IZ15/7, (<i>M.alba</i> L.) . - telófase II.	67
Figura 22 Microsporócitos do clone IZ15/7, (<i>M.alba</i> L.) em citomixia.	68
Figura 23 Vista da produção <i>in vitro</i> de raízes do clone IZ56/4, (<i>M.alba</i> L.)	74
Figura 24 Formação de calo na base do ápice foliar em cultura <i>in vitro</i> do clone IZ56/4 (<i>M.alba</i> L.)	77
Figura 25 a Metáfase em raiz do clone IZ56/4, (<i>M.alba</i> L.). pré-tratada com colchicina à 1% durante 4:30 horas. ...	81
Figura 25 b Metáfase em raiz do clone IZ56/4, (<i>M.alba</i> L.) pré-tratada com 8-hidroxiquinolina à 0,03% durante 2:45 horas.	81

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Produção mundial de casulos verdes e fios de seda no ano de 1994.	04
Tabela 2 Classificação da amoreira, <i>Morus</i> spp, segundo Koidzume.	11
Tabela 3 Características de 5 clones superiores eleitos em programa de melhoramento da amoreira (<i>M.alba</i> L.).	14
Tabela 4 Lista de algumas espécies de plantas com protocolos estabelecidos visando introdução <i>in vitro</i>	22
Tabela 5 - Lista de algumas espécies de amoreira, <i>Morus</i> spp, micropropagadas.	30
Tabela 6 Dados dos clones IZ15/1 e IZ15/7 e seus progenitores Calabresa e Nezumigaeshi (<i>M.alba</i> L.)	34
Tabela 7 Dados do clone IZ56/4 e seus progenitores Formosa e Catânia Paulista (<i>M.alba</i> L.)	40
Tabela 8 Solução de desinfecção utilizada para ápices foliares de amoreira (<i>M.alba</i> L.) no presente estudo.	41

	Página
Tabela 9 Características florais de clones de amoreiras (<i>M.alba</i> L.) utilizados.	46
Tabela 10 Produção <i>in vitro</i> de raízes nos 22 ensaios realizados com ápices foliares do clone IZ56/4 (<i>M.alba</i> L.), cultivados durante 60 dias.	70
Tabela 11 Pré-tratamentos usados para raízes de amoreira, (<i>M.alba</i> L.), no ano de 1994/95.	71
Tabela 12 Produção <i>in vitro</i> de raízes nos 12 ensaios realizados com ápices foliares do clone IZ56/4 (<i>M.alba</i> L.), cultivados durante 60 dias.	72
Tabela 13 Pré-tratamentos usados para raízes de amoreira, realizados com ápices foliares do clone IZ56/4 (<i>M.alba</i> L.), no ano de 1995.	73
Tabela 14 Protocolo de estabelecimento de ápices de amoreira, (<i>M.alba</i> L.) <i>in vitro</i>	73
Tabela 15 Pré-tratamentos usados para raízes de amoreira (<i>M.alba</i> L.), no ano de 1996.	75

ESTUDOS CITOLÓGICOS EM AMOREIRA,
***Morus alba* L.**

Autora : TAMARA CANTO FONSECA

Orientador : PROF. DR. GERHARD BANDEL

RESUMO

A amoreira, *Morus alba* L., é a forrageira utilizada na alimentação do bicho-da-seda, *Bombyx mori* L., pois fornece os aminoácidos necessários à produção do fio de seda.

O presente estudo foi idealizado com o objetivo de estudar a citologia da amoreira, o comportamento cromossômico na meiose e mitose e o estabelecimento de ápices foliares *in vitro*.

Para estudo da macrosporogênese utilizaram-se os clones IZ56/4 e IZ15/1 e para a microsporogênese o clone IZ15/7; oriundos do cruzamento entre clones Calabresa e Nezumigaeshi (IZ15/1 e 15/7) e entre os clones Formosa e Catânia Paulista (IZ56/4) do programa de melhoramento do Instituto de Zootecnia da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.

As flores masculinas no tamanho médio de 2,1mm foram coletadas durante três dias seguidos (setembro/1994) das 5h30 às 22h30 com intervalos de uma hora, imediatamente fixadas em etanol acético (3:1) por 24h e armazenadas em álcool a 70% a 10°C. As lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento em carmin propiônico 2%. Nenhuma irregularidade foi observada durante a microsporogênese.

O estudo do estabelecimento de ápices foliares *in vitro* visou a obtenção de raízes de amoreira para estudo dos cromossomos da metáfase mitótica. Neste trabalho foi utilizado o clone IZ56/4.

Os explantes excisados de estacas cultivadas em casa de vegetação foram cultivados em meio MS sólido (Murashige & Skoog, 1962), contendo metade de sua concentração original (MS/2) e 15gl⁻¹ de sacarose. A taxa média de estabelecimento de ápices foi 46%. As raízes obtidas foram tratadas com inibidores de fuso (8-hidroxiquinolina 0,03%; colchicina 0,01% e 0,05%) e/ou inibidores de síntese protéica (cicloheximida 140ppm) da fixação em etanol acético. Para coloração usou-se a metodologia de Feulgen. Os testes efetuados permitiram a contagem do número de cromossomos $2n = 28$ para a amoreira (*M.alba* L.).

CYTOLOGICAL STUDIES IN MULBERRY,
***Morus alba* L.**

Author: TAMARA CANTO FONSECA

Adviser: PROF. DR. GERHARD BANDEL

SUMMARY

Mulberry, *Morus alba* L., is a forage plant used to feed the silkworm, *Bombyx mori* L., as it provides the necessary aminoacids for the silk yarn production.

The present study was performed with the aim of studying the mulberry cytology, the chromosome behavior at meiosis and mitosis and the establishment of *in vitro* leaf apex culture.

For the macrosporogenesis studies, the clones IZ56/7 and IZ15/1 were used. For the microsporogenesis studies, the clone IZ15/7 was used. The clones IZ15/1 and IZ15/7 are full-sib progeny of the cross between Calabresa and Nezumigaeshi clones and the clone IZ56/4 are from the cross between Formosa and Catânia Paulista clones, of the plant

breeding program of the Instituto de Zootecnia, from the Secretaria da Agricultura e Abastecimento of the State of São Paulo.

The male flowers, of a medium size of 2,1 mm, were collected during three consecutive days (September/1994) from 5:30 a.m. to 10:30 p.m. with one hour interval, immediately fixed in acetic ethanol (3:1) for 24h and stored in 70% alcohol at 10°C. The slides were prepared by smear method in 2% propionic carmin. No irregularity was observed during microsporogenesis.

The study of establishing *in vitro* leaf apex culture aimed at obtaining mulberry roots for study of mitotic metaphase. The clone used in this study was IZ56/4.

The explants excised from cultivated cuttings in the greenhouse were cultivated in solid MS (Murashige & Skoog, 1962) medium, containing half of its original concentration (MS/2) and 15gl⁻¹ of sucrose. The medium rate of apex establishment was 46%. The roots obtained were treated with spindle inhibitors (0,03% 8-hydroxiqiloine, 0,01% and 0,05% colchicine) and/or protein synthesis inhibitors (140ppm cycloheximide) for several times before fixation in acetic ethanol. For staining, the Feulgen methodology was used. The tests allowed the counting of 2n = 28 chromosome number for mulberry (*M.alba* L.).

1 INTRODUÇÃO

A origem da sericicultura não é bem esclarecida, mas há mais de 6.000 anos os chineses são considerados como os descobridores do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) inseto esse considerado como domesticado.

A história conta que por volta de 2.600 AC o imperador chinês Hwang-Te delegou a criação do bicho-da-seda a sua esposa Hsi-Ling-Shi, que desenvolveu a tecnologia da produção do fio e tecido da seda para seu uso exclusivo. O segredo ficou guardado por mais de 3.000 anos.

A primeira menção autêntica sobre a seda acha-se entre as crônicas de Chew-king em 2.000 AC e depois disso, a seda passou a ser usada nos melhores lugares de cerimoniais públicos e foi símbolo de homenagem aos imperadores.

Com a construção da “ Rota da Seda” (6.400 km) no período do reinado do imperador chinês Wu-Ti, no ano de 140 AC, ocorreu a introdução da seda no ocidente e restante do oriente, com a posterior difusão para os outros pontos do mundo. Hoje a sericicultura é conduzida em mais de 20 países como o Japão, China, Rússia, Índia, Coreia, Itália, França e Brasil.

No Brasil a produção de seda teve seu início quando o imperador D.Pedro II, no século XIX, instalou a primeira indústria denominada “Companhia Seropédica Fluminense”, na cidade de Itaguaí, Rio de Janeiro. Em 1921, Francisco Matarazzo implantou a SA Indústria de Seda Nacional, em Campinas, SP.

Atualmente, a situação da sericicultura brasileira é de expansão na produção de casulos e fios de seda, concentrando-se a sua produção nos Estados do Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Espírito Santo, Rio Grande do Norte e Roraima.

Não obstante o bicho-da-seda possa ser alimentado de algumas outras plantas, a folha de amoreira é o seu alimento mais adequado pois fornece os aminoácidos necessários à produção do fio de seda.

Através de dados estatísticos verificou-se que a produtividade de casulos por área de amoreira cultivada no Estado de São Paulo era muito baixa quando comparada a do Japão (Scarpelli, 1968). A causa principal era atribuída ao fato dos amoreirais serem formados com antigas variedades pouco produtivas em folhas e estas serem pobres em elementos nutritivos ao bicho-da-seda. Em 1968, o Japão já registrava uma produtividade de 747,92kg/ha de casulos (Overseas Technical Cooperation Agency, 1971) enquanto no Estado de São Paulo a produtividade era ainda 247,30kg/ha¹.

¹ Instituto de Economia Agrícola - Prognóstico 1980/81.

Este alto rendimento apresentado pelo Japão era devido, entre outros fatores, principalmente ao uso de clones híbridos de alta produtividade, com folhas ricas em elementos nutritivos (Hazama, 1968) .

Um intenso programa de melhoramento da amoreira foi então desenvolvido a partir de 1965, no Serviço de Sericicultura de Campinas, mais tarde incorporado ao Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, como Seção de Sericicultura. Hoje todo o banco de germoplasma oriundo deste programa encontra-se no Centro Estadual de Pesquisa Aplicada em Sericicultura (CEPAS), Gália, SP, com clones que deram um impulso na produtividade dos amoreirais.

Segundo dados da Associação Brasileira de Fiações de Seda, o nível nacional de produção de casulos verdes soma 16.260 toneladas empregando mais de 11.000 famílias que cultivam cerca de 960.000 ha de amoreira. Atualmente, estima-se em cerca de 50.000 pessoas envolvidas diretamente na sericicultura (ABRASSEDA, 1995²).

A nível mundial o Brasil coloca-se em 5º lugar na produção de casulos verdes e fios de seda (Tabela 1). Pelos dados fornecidos pela ABRASSEDA (1997)³, pode-se observar que a China, juntamente com a Índia, detêm 88,6% e 84,0% da produção de casulos e fios de seda, respectivamente. Isto nos dá idéia de que apesar do uso ocidental de seda, principalmente para alta costura, o grande volume de consumo está ligado ao uso das vestimentas tradicionais, muito valorizadas entre os povos asiáticos.

² ABRASSEDA (Associação Brasileira de Fiações de Seda, São Paulo) informe estatístico 1995.

³ ABRASSEDA (Associação Brasileira de Fiações de Seda, São Paulo) informe estatístico 1997.

Tabela 1. Produção mundial de casulos verdes e fios de seda no ano de 1994

PAÍSES	Casulos Verdes			Fios de Seda		
		TON	%		TON	%
China	1º	777.000	76,0	1º	66.060	69,4
Índia	2º	128.300	12,6	2º	13.914	14,6
ex-URSS	3º	32.000	3,1	4º	2.850	3,0
Tailândia	4º	21.200	2,1	6º	1.788	1,9
Brasil	5º	18.300	1,8	5º	2.538	2,7
Vietnam	6º	15.000	1,5	7º	1.500	1,6
Coréia do Norte	7º	14.000	1,4	8º	1.380	1,4
Japão	8º	7.700	0,7	3º	3.900	4,1
Coréia do Sul	9º	900	0,1	9º	492	0,5
Turquia	10º	500	0,0	10º	78	0,1
Outros		7.000	0,7		678	0,7
Total		1.021.900	100,0		95.178	100,0

Fonte : ABRASSEDA, 1997

A seda movimenta bilhões de dólares anualmente no mercado internacional, oferecendo boas perspectivas para países em desenvolvimento.

Okamoto e Tinoco, 1996⁴ enfatizaram a importância social e econômica da sericicultura, empregando mão-de-obra familiar em pequenas propriedades e fixando o homem no campo, numa área que gera divisas ao país devido a exportação.

O objetivo deste trabalho foi estudar a citologia da amoreira considerando que no gênero *Morus*, a literatura é muito escassa (Datta, 1954), Susheelamma et al., 1990) e no Brasil inexistente.

⁴ OKAMOTO, F.; TINOCO, S.T.J. Análise da Cadeia Produtiva de Sericicultura. Trabalho realizado para a Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 1996. p.33.

O primeiro objetivo deste trabalho foi a análise da microsporogênese e da macrosporogênese de alguns clones da espécie *Morus alba* L.

Outro objetivo foi o estudo dos cromossomos mitóticos tendo em vista as observações e dúvidas relatadas por vários pesquisadores, quanto ao seu tamanho e morfologia (Sinoto, 1929; Royan-Subramanian, 1965 e Gill e Gupta, 1979). Para a observação dos cromossomos mitóticos foram obtidas raízes oriundas do cultivo *in vitro* visando-se um estudo sobre o estabelecimento dos ápices foliares em meio de cultura, protocolo que poderá ser usado na micropropagação de amoreirais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características botânicas da amoreira, *Morus alba* L.

A amoreira, *Morus alba* L., é uma planta lenhosa cujas folhas são usadas como alimento das larvas do bicho-da-seda, (*Bombyx mori* L.) o qual pode sobreviver, crescer e até produzir casulos fracos quando alimentado por folhas de outras plantas, mas somente sobre folhas de amoreira atinge o encasulamento normal e a sua reprodução (Oka & Ohyama, 1986).

A distribuição da amoreira se dá em várias regiões do mundo (Ting-Zing et al., 1988) a qual confunde-se com os seus centros de origem (O.T.C.A., 1971), classificados como:

- (1) Parte sudoeste da Ásia continental e Japão;
- (2) Ilhas de Java e Sumatra;
- (3) Oman e parte sudoeste da Índia;
- (4) Cáucaso, Pérsia e Ásia ocidental;
- (5) Oeste da África;
- (6) América do Sul e do Norte

Esta distribuição ampla reflete segundo Ting-Zing et al. (1988) a adaptabilidade da amoreira aos vários ambientes, subtropical, tropical e temperado.

Rangaswami et al. (1976) consideram a taxonomia da amoreira bastante confusa talvez devido a duas causas principais, à sua ampla distribuição e origem e à polinização cruzada, o que gera grande variação nos caracteres, dificultando a sua classificação. Vários taxonomistas têm tentado classificar a amoreira usando para isto diferentes sistemas.

Um histórico cronológico sobre as primeiras tentativas de classificação taxonômica da amoreira pode ser encontrado nas publicações da Food and Agriculture Organization of the United Nations (Rangaswami et al., 1976 e Ting-Zing et al., 1988) e da Overseas Technical Cooperation Agency (O.T.C.A., 1971), assim resumidos:

- O primeiro botânico a classificar a amoreira foi Carolus Linnaeus por volta de 1750, colocando-a dentro da família *Moraceae*, e do gênero *Morus* com cinco espécies: *Morus alba* L.; *M.nigra* L.; *M.rubra* L.; *M.tartarica* L. e *M.indica* L.
- Depois de Linnaeus, somente por volta de 1850, Ledebour usando como critério taxonômico o estudo de papilas e pelos sobre o estigma classificou a amoreira em duas espécies, *M.alba* e *M.nigra*.
- O botânico francês, Seringe, classificou as amoreiras em oito espécies em 1855, enquanto que outro botânico francês, Ed Burreau, em 1873 classificou-as em duas espécies, apoiado em caracteres externos e dividiu a

M.alba em duas seções, pelo comprimento e forma da inflorescência feminina e sincarpo, subdivididas pelo comprimento do estilo.

- Também Brandis em 1906 descreveu a classificação das espécies de amoreira em duas seções baseado no comprimento do estilo e subdividiu uma seção baseado no comprimento e forma do sincarpo e outra nas características da folha.

- O botânico alemão Schneider em 1916, classificou as amoreira em três espécies com sete variedades.

- Koidzume em 1917 e 1923 classificou as amoreiras baseado na morfologia da flor feminina agrupando-as em duas seções (Dolichostylae e Macromorus) usando numa primeira divisão o comprimento do estilo, a exemplo de Brandis, e numa segunda divisão as características do estilo, pubescente e papiloso (Figura 1).

Figura 1- Características do estilo da amoreira (*M.alba* L.) segundo Koidzume (1917,1923 in: Rangaswami et al.,1976)

- Diferentemente, Hotta em 1930, dividiu as espécies de amoreira em dois grupos (Dolychocystolithiae e Brachycystolithiae), de acordo com a forma e a localização da célula cistolítica nas folhas. Em 1954 ele mudou sua classificação e, a exemplo de Koidzume, dividiu as espécies em duas seções com base nas características do ramo e folhas.

A classificação botânica da amoreira segundo Barley (1954) é:

Grupo	<i>Moraea</i>
Família	<i>Moraceae</i>
Sub-família	<i>Moraideae</i>
Gênero	<i>Morus</i>

Katsumata (1971) propôs um outro tipo de classificação, baseado no tipo de idioblasto existente nas folhas da amoreira (94 tipos).

O número de espécies dentro do gênero *Morus* varia conforme alguns autores. Para Patel et al.(1983) o gênero *Morus* abrange cerca de 30 espécies no mundo, entre elas *M.australis*, *M.nigra*, *M.bombycis*, *M.alba*, etc. Estas espécies são lenhosas, arborescentes, com suco leitoso, aquênios não separados. Frutos externos em uma densa espiga ou cabeça, estéreis ou férteis, espigas separadas parecendo um cacho; folhas denteadas, as vezes lobadas, glabras ou pubescentes somente nas nervuras inferiores, superfície superior brilhante e lisa. Outras espécies de amoreira também são importantes por seus frutos comestíveis e madeira aproveitável.

Entretanto, segundo O.T.C.A.(1971) e Rangaswami et al.(1976) a classificação mais usada pelos pesquisadores é a de Koidzume (1917,1923) onde o gênero *Morus* tem 35 espécies identificadas pela presença ou ausência e comprimento do estilo na flor feminina (Tabela 2, Figura 2).

Figura 2 - *Morus* spp classificadas pela presença ou ausência e comprimento de estilo segundo Koidzume (O.T.C.A., 1971)

Destas 35 espécies de *Morus* muitas são poliplóides. A amoreira tem $n=14$, como número básico cromossômico e vários graus de ploidia. A literatura somente relata o cariótipo de 6 delas, apresentadas a seguir:

Tabela 2 - Classificação da amoreira (*Morus* spp.) segundo Koidzume (O.T.C.A.,1971 e Rangaswami et al.,1976)

	Espécie	Habitat
Seção DOLYCHOSTYLAE Koidzume (estilo curto)		
Pubescente	<i>M.arabica</i> KOIDZ	Arábia, Oman
	<i>M.mizuho</i> HOTTA	Japão
Papiloso	<i>M.mongolia</i> SCHN	China, Coréia
	<i>M.nigriformis</i> KOIDZ	China
	<i>M.notabilis</i> SCHN	China
	<i>M.bombycis</i> KOIDZ	China, Japão, Coréia, Tailândia
	<i>M.rotundifolia</i> KOIDZ	Tailândia
	<i>M.acidosa</i> GRIFF	Himalaia, China, Formosa, Japão
	<i>M.kagayamae</i> KOIDZ	Japão
	<i>M.yoshimurai</i> HOTTA	Japão
	<i>M.cordatifolia</i> HOTTA	Japão
	<i>M.formosensis</i> HOTTA	Formosa
Seção MACROMORUS Koidzume (estilo longo)		
Pubescente	<i>M.serrata</i> ROXB	Himalaia
	<i>M.nigra</i> L.	Ásia, Cáucaso, Pérsia
	<i>M.tiliaefolia</i> MAKINO	Japão, Coréia
	<i>M.cathayana</i> HEMSLEY	China
Papiloso	<i>M.mosozygia</i> STAFF	África, Sudão
	<i>M.laevigata</i> WLAL	Himalaia, China
	<i>M.insignis</i> BUR	América do Sul
	<i>M.macroua</i> MIQ	Himalaia, Java , Sumatra
	<i>M.rubra</i> L.	América do Norte
	<i>M.mollis</i> RUSBY	México
	<i>M.celtidibolia</i> KUNTH	América do Norte e Sul
	<i>M.microphylla</i> BUCKL	América do Norte
	<i>M.boninensis</i> KOIDZ	Japão
	<i>M.lhou</i> KOIDZ	China
	<i>M.alba</i> L.	China
	<i>M.atropurpurea</i> ROXB	China
	<i>M.viridis</i> HAMILTON	Índia
	<i>M.peruana</i> PLANCHON	Peru
	<i>M.yunnanensis</i> KOIDZ	China
	<i>M.wallichiana</i> KOIDZ	Índia, Butão, China
	<i>M.wittiorum</i> HANDEL	Tailândia
	<i>M.mallotifolia</i> KOIDZ	Tailândia
	<i>M.miyabeana</i> HOTTA	Japão

diplóides -	<i>M.lhou</i> ; <i>M.alba</i> ; <i>M.bombycis</i>
hexaplóide -	<i>M.tiliaefolia</i>
octaplóide -	<i>M.laevigata</i>
22-plóide -	<i>M.nigra</i>

No Brasil encontram-se no acervo do Instituto de Zootecnia, no Centro Estadual de Pesquisa Aplicada a Sericicultura (CEPAS), 29 variedades e clones híbridos, sendo a maioria pertencente a espécie *Morus alba* L.

Na espécie *M.alba*, as flores tem estilo ausente ou muito curto, e a maioria dos ramos apresenta coloração marrom acizentada. Suas folhas são redondas, inteiras e/ou lobadas, com ponta pequena ou aguda, margens afiadas e superfície lisa com 2/5 de filotaxia (Rangaswami et al.,1976).

Apesar da reconhecida influência da qualidade das folhas da amoreira sobre a produção de casulos (Fonseca et al.,1990), o volume quantitativo de folhas responde, segundo Das & Krishinaswami (1969), por 2/3 do custo do casulo. O aumento da produtividade pode ser feito pela utilização de clones de alta produção e numerosos trabalhos sobre o tema têm sido realizados. Sendo a amoreira uma espécie dióica de propagação vegetativa, os pesquisadores tem hibridizado plantas portadoras de características favoráveis, tais como: reprodução por estaquia, folhas grandes e inteiras, internódios curtos, precocidade de brotação, entre outras, para posterior seleção. As plantas obtidas contendo os caracteres favoráveis

antes contidas em plantas diferentes, são multiplicadas vegetativamente constituindo novos clones (Almeida et al., 1991).

A expressão sexual da amoreira é dependente da variedade podendo ser monóica, isto é, apresentar os dois sexos em flores separadas na mesma planta, como ocorre no clone IZ56/4, ou dióica, isto é, apresentar os dois sexos em plantas separadas, o que ocorre nas variedades e na maioria dos clones melhorados existentes na coleção do CEPAS.

Entretanto, a expressão sexual da amoreira parece ser influenciada pelas condições ambientais, podendo ser alterada dependendo da região onde for cultivada. Este fenômeno pôde ser constatado em observações visuais (dados não publicados) com o clone IZ56/4 que na região de Limeira, SP, produziu flores femininas e na região de Gália, SP, apresentou variações na sua sexualidade, como segue. Em 1991, produziu em sua maioria, inflorescências masculinas, mas apresentou em cerca de 5% delas, flores femininas em sua base. Em 1992, no início da safra, as inflorescências eram masculinas, no meio da safra, as inflorescências eram mistas e no final da safra, femininas. Em 1993 voltou ao fenótipo apresentado em 1991

Fonseca et al. (1985b), realizaram um programa de melhoramento da amoreira visando a obtenção de clones híbridos de alta produção e boa qualidade nutritiva e propagação por estaquia, aliando características positivas das variedades de propagação por enxertia e de alta produção com a rusticidade das variedades de propagação por estaquia. Neste programa de melhoramento, iniciado em 1965, foram feitos cruzamentos entre todas as variedades existentes no campo de germoplasma

da extinta Estação Experimental de Sericicultura de Limeira, SP. Deste programa foram eleitos 5 clones (Fonseca et al.,1982) cujas características estão na Tabela 3.

Tabela 3 - Características de 5 clones superiores eleitos em programa de melhoramento, em comparação com a variedade padrão Calabresa (*M.alba* L.) (Fonseca et al.,1982)

CLONES	PROGENITORES	FOLHAS	SE-XO	PM* Kg/ha	T.P.**
IZ 13/6	Fernão Dias x Kokuzo 27	Grande, Inteira e/ou Lobada.	M	19.983	22,93
IZ 15/7	Calabresa x Nezumigaeshi	Grande, Inteira e/ou Lobada.	M	14.274	22,41
IZ 19/13	Talo Roxo x Kokuzo 27	Grande, Inteira	F	17.021	21,21
IZ 56/4	Formosa x Cat. Paulista	Grande, Inteira e/ou Lobada	F	20.416	22,36
IZ 57/2	Formosa x Kokuzo 27	Grande, Inteira	F	18.859	20,94
Calabresa	testemunha	Pequena e Recortada	F	8.651	21,24

* P.M. =Produção Média de folhas verdes de amoreira obtida em 4 ensaios de competição

** T.P. = Teor de Proteína Fonte : Fonseca et al., 1982

M = masculino

F = feminino

As quatro variedades progenitoras dos referidos clones são da espécie *M.alba* e são descritas a seguir, segundo Fonseca et al.(1985a):

- Calabresa: Importada da Itália, otimamente aclimatada, é produtiva, rústica e bastante precoce. Reproduz-se bem por estaquia.
- Formosa: Originária da Ilha de Formosa, muito bem aclimatada, é precoce, produtiva e vigorosa. Reproduz-se facilmente por estaquia.
- Catânia Paulista: Obtida no Posto Experimental de Limeira, tem caracteres semelhantes às variedades Catânia 1 e Catânia 2 importadas da Itália, daí sua denominação. É precoce, vigorosa, produtiva mas não se reproduz bem por estaquia.
- Nezumigaeshi: Importada do Japão onde é denominada Kairyo-nezumigaeshi, é considerada como variedade valiosa economicamente entre

as cultivadas. É bem aclimatada, produtiva, rústica e vigorosa, mas não se reproduz bem por estaquia.

2.2 Citologia

Dentre os gêneros complexos que têm desafiado os esforços de taxonomistas e permanecido críticos e confusos, o gênero *Morus*, parece ter lugar próprio devido ao livre cruzamento entre suas espécies. A população disponível é altamente heterogênea e a classificação é feita somente pelos caracteres morfológicos, o que a torna complexa. As informações no campo da citologia, cariomorfologia, biologia reprodutiva, etc., são insuficientes para responder alguns enigmas enfrentados pelos taxonomistas clássicos (Susheelamma et al. 1990).

Koidzume em 1917 e Hotta em 1953 (Susheelamma et al. 1990) classificaram o gênero *Morus* baseando-se nos caracteres morfológicos da flor feminina e Katsumata (1972) observou alguns caracteres fisiológicos além dos morfológicos. Entretanto, os dois sistemas foram considerados incompletos pela falta de dados citológicos e embriológicos.

Sinotô (1929) faz um relato dos dois primeiros estudos sobre os cromossomos do gênero *Morus*. Em 1909, Tahara foi o primeiro a investigar citologicamente plantas do gênero *Morus*, incluindo *M.indica* e *M.alba*. Ele observou que, à exceção de uma variedade da última espécie, todas tinham número haplóide de cromossomos igual a 14 ($2n = 28$). Este autor também observou algumas diferenças no tamanho de três pares de

cromossomos nas células somáticas, os quais ele denominou a, b e d, e que apresentavam formas, significativamente diferentes dos 11 pares restantes. Em 1920, Osawa pesquisou 85 raças de *Morus*, observando que 45 delas tinham número haplóide variável. Os dois autores concordaram quanto ao número de cromossomos mas discordaram quanto aos pares de cromossomos maiores, que para Tahara eram dois e para Osawa um.

Estudando a meiose de *M. bombycis*, Sinotô (1929) chegou as mesmas conclusões que Osawa em relação aos cromossomos grandes no gênero *Morus* e relatou que plantas masculinas de *M. bombycis* tinham um par desigual além dos treze pares de cromossomos. Ele denominou esse cromossomo maior de cromossomo “1”, e observou que dos quatorze presentes nos gametas um é maior, dois são médios e onze são pequenos.

Estudos mitóticos e meióticos realizados posteriormente (Gill & Gupta, 1979) relatam a existência de dois cromossomos de tamanho maior no complemento diplóide das espécies independente do tipo sexual. Isto confirma os relatos sobre a presença de um par de cromossomos maiores em *M. alba* e espécies afins (Tahara, citado por Sinotô, 1929; Royan-Subramanian, 1965; Gill & Gupta, 1979). Tahara e Osawa (Sinotô, 1929) referiram-se a estes cromossomos de tamanho diferenciados como alossomos a e b, e sugeriram que eram responsáveis pela determinação sexual das espécies dióicas.

A maioria das espécies de *Morus* é diplóide tendo 28 cromossomos. Entretanto, entre elas uma grande escala de poliploidia, indo do estado $2n = 2x = 28$ até $2n = 22x = 308$ tem sido relatada por Fedorov (1969) segundo Basavaiah et al. (1989). Entretanto, em 1990, Basavaiah et

al. observam que a espécie *M.nigra* ocupa posição única entre as plantas com flores exibindo 308 cromossomos, e relatam que Agaev discorda desta contagem cujo número real seria $2n = 22x = 330$ cromossomos.

Muitas espécies poliplóides, especialmente triplóides, são cultivadas na parte noroeste do Japão e são notadas por sua resistência à temperaturas frias e doenças. Elas têm bom desenvolvimento vegetativo e a qualidade de suas folhas é superior à das diplóides. Triplóides são produzidos por cruzamento de espécies diplóides e tetraplóides induzidas artificialmente. Tetraplóides servem como um bom material de melhoramento além de seu uso na alimentação do bicho-da-seda (Rangaswami et al., 1976).

A poliploidia, especialmente aneuploidia, parece ser de ocorrência comum no gênero *Morus* indicando ter contribuído para a sua evolução, o que é evidenciado pela existência de aneuplóides com $2n = 26$, 27 e 30. Kundu e Sharma sugerem ainda que esta ocorrência de aneuplóides é provavelmente devida à extensiva propagação vegetativa que este gênero sofre (Sinotô, 1929; Das, 1961 e Kundu and Sharma, 1948 in: Susheelamma et al., 1990)..

No trabalho de Susheelamma et al., 1990, foram estudadas várias populações de *M.bombycis*, *M.latifolia* e *M.alba*. Os autores observaram que a cultivar Chinapeking de *M.alba* é aneuplóide ($2n=30$) e que a cultivar Kenmori de *M.bombycis* tem satélites no braço curto do cromossomo maior. Os autores concluíram que a fecundação cruzada tem desempenhado papel importante na origem dos aneuplóides, devido à formação de gametas com número não balanceado de cromossomos em

todas as cultivares estudadas. Os autores observaram ainda que a identidade citológica foi representada por uma variação fenotípica, enfatizando que pesquisas cariomorfológicas associadas a informações sobre o comportamento meiótico, bioquímico e fisiológico parecem essenciais para auxiliar os taxonomistas na classificação do gênero.

M.serrata Roxb., conhecida como amoreira do Himalaia é reconhecida como uma espécie valiosa de madeira, porém não tem sido usada como fonte de alimento ao bicho-da-seda. Basavaiah et al. (1989), descreveram esta espécie como hexaplóide ($2n = 6x = 84$) contrariando relatos de Janaki Ammal (Susheelamma et al., 1990) que a considerou como diplóide. Datta (1954) ao descrever a espécie a *M.laevigata* a considerou como tetraplóide ($2n = 56$) contrariando também Janaki Ammal que a havia descrito como diplóide.

Janaki Ammal (Susheelamma et al. 1990) observou que a *M.cathayana* é facilmente distinguível da *M.alba* por seu fruto cilíndrico, folhas pilosas e a existência de três genótipos: $2n = 56$ (4x), $2n = 84$ (6x) e $2n = 112$ (8x).

Katsumata & Ishiguro (1980) trabalharam com *M.cathayana*, uma espécie diplóide ($2n = 28$) e observaram que os dois cromossomos maiores têm $1,7\mu\text{m}$ de comprimento, os médios $1,1\mu\text{m}$ e os menores $0,7\mu\text{m}$. Os autores relatam ainda a localização do centrômero embora tenham tido dificuldades na identificação do mesmo nos cromossomos menores e classificaram os cromossomos em cinco tipos (metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos, acrocêntricos e telocêntricos).

A espécie *M.nigra*, chamada de amoreira preta, é cultivada em muitos países por seus frutos comestíveis, não sendo usada na sericicultura porque suas folhas são ásperas e não palatáveis às larvas do bicho-da-seda. Entretanto, são usadas nos programas de melhoramento em cruzamentos com outras espécies. Ela ocupa posição única entre as plantas com flores exibindo 22-ploidia (22x) com número de cromossomos $2n = 308$ (Basavaiah et al. 1990).

Dentre as observações citológicas realizadas com a amoreira, *Morus* spp, Verma et al., (1986), relatou pela primeira vez a ocorrência de citomixia .

Em 1931, Woodworth postulou que citoplasma heterozigoto favorecia a citomixia e em 1941, Levan relatou que embora as causas que levavam à citomixia não fossem muito claras, duas explicações eram geralmente aceitas, isto é, que tipos geneticamente não balanceados (tais como, híbridos, haplóides, triplóides) e que estágios iniciais da meiose favoreciam a ocorrência do fenômeno (Verma et al., 1986).

A poliploidia, principalmente a triploidia tem sido usada pelos melhoristas da amoreira que a consideram superiores às diplóides em produção e qualidade nutritiva das folhas (Seki and Oshikane, 1985; Dzhaferrov and Alekperova, 1978 in: Basavaiah et al., 1990).

Em 1986, Verma et al, trabalharam com um triplóide originado do cruzamento entre um diplóide e um tetraplóide, observando o aparecimento da citomixia em praticamente todas as fases da meiose, e ponderaram que o triplóide resultante deste cruzamento podia ser geneticamente não balanceado favorecendo a citomixia. Os autores

concluíram que apesar da esterilidade nos triplóides ser consequência do comportamento de seus cromossomos durante a divisão meiótica, que a citomixia também era responsável pela esterilidade. A citomixia levava a uma considerável redução do número de grãos-de-pólen devido a degeneração das células que continham pouco ou nenhum material genético e que a maioria das células que atingiam o final da meiose seriam geneticamente desbalanceadas, com maior ou menor número de cromossomos. Abdullaev et al. (Verma et al., 1986), entretanto, consideravam a esterilidade útil ao cultivo da amoreira pois leva a alta produção e nutritividade.

2.3 Micropropagação

Debergh & Read (1991) definem a micropropagação como a “propagação true-to-type de um genótipo selecionado usando as técnicas da cultura *in vitro*”.

Desde o sucesso de Murashige & Skoog (1962) na propagação do tabaco, sua formulação vem sendo muito usada como modelo pela maioria dos pesquisadores. O lançamento do trabalho de Murashige (1974) propondo um protocolo para micropropagação de plantas deu novo impulso a área. Debergh & Read (1991) propuseram 5 estágios para o estabelecimento da micropropagação: estágio 0 = estágio preparatório; estágio 1 = início da cultura; estágio 2 = multiplicação; estágio 3 = clonagem e indução de raízes; estágio 4 = transferência para condições de casa de vegetação.

Plantas mutantes oriundas da cultura *in vitro* têm inquietado os produtores. As características atípicas podem ser , nanismo, mudança de cor, mosaicismos, mudanças no hábito de crescimento e produtividade. A genética molecular bem como estudos fisiológicos e citológicos têm permitido, segundo Swartz (1991), maiores entendimentos sobre a origem destas variações.

Em consulta feita aos periódicos Plant Cell Reports e Plant Cell, Tissue and Organ Culture (1981 - 1995) foram encontrados 25 trabalhos (Tabela 4) cujo objetivo principal é a multiplicação *in vitro* de espécies importantes que se mostram recalcitrantes na propagação vegetativa. Esses trabalhos salientam que a multiplicação *in vitro* deve manter o tipo verdadeiro, ou seja, visar o estabelecimento de um protocolo que não ofereça risco de incidência de variação somaclonal. A procura pela introdução *in vitro* de ápices foliares está também ligada à necessidade de se obter uma produção rápida de uma grande quantidade de mudas. A Tabela 4 apresenta uma lista de espécies alimentícias (9), plantas medicinais (8), forrageiras (3), ornamentais (3) e florestais (2) para as quais protocolos de micropropagação foram estabelecidos.

A fonte de explantes variou desde raízes até brotos apicais (Erdei et al.,1981; Pérez et al.,1985; Dhawan & Bhojwani,1985; Hovanesian & Torres,1986; Jha & Jha,1989; Rout & Das,1993; Christopher & Rajan ,1994; Berger & Schaffner,1995) os quais foram retirados de plantas assépticas. Os explantes foram igualmente retirados de plantas adultas desenvolvidas no campo ou casa de vegetação. Foram utilizados segmentos nodal e apical (Shipton,1982; Padhya & Mehta,1982; Sita &

Rani,1985; Ideda et al.,1988; Reed,1991; Jha & Sen,1992; Pandey et al.,1992; Wawrosch et al.,1994), brotos foliares (Tamura et al.,1984; Banerjee & Langhe,1985; Shipton & Jackes,1986; Jha & Sen,1992; Corchette et al.,1993; Krishinan & Seenii,1994; Krishinan et al.,1995), brotos florais (Hiraoka et al.,1984), rizomas (Hosoki et al.,1989) e explantes foliares (Raubert & Grunewaldt,1988)

Tabela 4 - Lista de algumas espécies de plantas com protocolos estabelecidos visando à introdução *in vitro*.

ESPÉCIE	USO	REFERÊNCIA
<i>Digitalis lanata</i>	medicinal	ERDEI et al.,1981
<i>Callistemon viminalis</i>	ornamental	SHIPTON,1982
<i>Nephrolepis</i>	ornamental	PADHYA & MEHTA,1982
<i>Atractylodes lancea</i>	medicinal	HIRAOKA et al.,1984
<i>Stevia rebaudiana</i>	açúcar	TAMURA et al.,1984
<i>Leucaena leucocephala</i>	forrageira	DHAWAN & BHOJWANI,1985
<i>Musa spp</i>	banana	BERNEJEE & LANGHE,1985
<i>Eucalyptus grandis</i>	florestal	SITA & RANI,1985
<i>Corylus avellana</i>	frutífera	PÉREZ et al.,1985
<i>Leptospermum spp</i>	chá	SHIPTON & JACKES,1986
<i>Uniola paniculata</i>	forrageira	HOVANESIAN & TORRES,1986
<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	medicinal	IDEDA et al.,1988
<i>Allium spp</i>	alho	RAUBER & GRUNEWALDT, 1988
<i>Paeonia lactifolia</i>	ornamental	HOSOKI et al.,1989
<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	medicinal	JHA & JHA,1989
<i>Limnanthes spp</i>	óleo	REED,1991
<i>Camelia sinensis</i>	chá	JHA & SEN,1992
<i>Allium tuberosum</i>	cebolinha	PANDEY et al.,1992
<i>Ulmus pumila</i>	florestal	CORCHETE et al.,1993
<i>Madhuca longifolia</i>	medicinal	ROUT & DAS,1993
<i>Woodfordia fruticosa</i>	medicinal	KRISHNAN & SEENI,1994
<i>Achillea asplenifolia</i>	medicinal	WAWROSCHE et al.,1994
<i>Capsicum spp</i>	pimenta	CHRISTOPHER & RAJAN,1994
<i>Swartzia madagacariensis</i>	forrageira	BERGER & SCHAFFNER,1995
<i>Trichopus zeylanicus</i>	medicinal	KRISHINAN et al.,1995

Fonte: Plant Cell Reports e Plant Cell, Tissue and Organ Culture (1981 - 1995)

A desinfecção utilizada nos vários trabalhos, independentemente do tipo de explante utilizado, fez uso do cloreto de mercúrio (HgCl_2) ou do hipoclorito de sódio (NaOCl), em diferentes concentrações e tempos de exposição. Cerca de um terço deles lavam o explante em etanol (70%, v/v) para romper a tensão superficial e permitir uma desinfecção mais eficiente. A adição de algumas gotas de Tween (um agente quelante) é relatada em alguns dos trabalhos que utilizam NaOCl ou HgCl_2 (Reed, 1991; Ideda et al. 1988; Hiraoka et al., 1984).

Poucos trabalhos relatam as taxas de contaminação verificadas no início da cultura. Em espécies de *Allium* observou-se 9% de contaminação no alho porró, 60% no alho comum e 0% na cebolinha (Rauber & Grunewaldt, 1988); em *Limnanthes* spp observou-se uma alta taxa de contaminação devida ao tipo de formação das rosetas (Reed, 1991); em *Uniola paniculata* observou-se 33% (Hovanesian & Torres, 1986) e em *Leucaena leucocephala* 20 a 30% (Dhawan & Bhojwani, 1985). Foram também observadas altas taxas de contaminação quando se utilizou o HgCl_2 como desinfetante de *Camelia sinensis* (Jha & Sen, 1992) e *Trichopus zeylanicus* (Krishnan et al., 1995). Taxas entre 10 a 30% foram observadas em *Woodfordia fruticosa* (Krishnan & Seeni, 1994). A desinfecção com HgCl_2 usada em *Trichopus zeylanicus* foi letal ao tecido quando o tempo de exposição foi maior que sete minutos, embora tenha reduzido a menos de 15% a taxa de contaminação (Krishnan et al., 1995).

O meio de cultura básico mais utilizado, com algumas exceções, foi o MS (Murashige & Skoog, 1962). O trabalho de Krishnan & Seeni (1994), com *Woodfordia fruticosa*, uma planta medicinal, relata

problemas com exudação de fenóis no meio de cultura, tendo sido controlada com três mudanças sucessivas, a cada três dias, para meio fresco. A emergência de um broto ocorreu em 75% dos explantes em meio livre de hormônios, mas o desenvolvimento posterior dependeu da presença de BAP (6-benzilaminopurina). Já em *Musa* spp, o controle de oxidação do meio de cultura foi obtido pela adição de ácido ascórbico (Banerjee & Langhe 1985).

A emergência e crescimento dos brotos assim como o enraizamento deles, dependeu na maioria dos relatos da adição de citocininas e auxinas, ao meio de cultura basal. As citocininas mais usadas e que mostraram maior eficiência foram a BAP e a BA (benziladenina) sozinhas ou em combinação com auxinas. Também KIN (cinetina) mostrou-se eficiente na indução de brotos em *Stevia rebaudiana* (Tamura et al. 1984), *Trichopus zeylanicus* (Krishnan et al. 1995) e *Cephaelis ipecacuanha* (Ideda et al. 1988 e Jha & Jha 1989). O enraizamento ocorreu em meio livre de fitoreguladores (Rauber & Grunewaldt, 1988; Hiraoka et al. 1984; Wawrosch et al. 1994) ou com a adição de IBA (ácido indol-butírico), IAA (ácido indol-acético) e NAA (ácido naftaleno acético). Em *Corylus avellana*, as raízes não se tornaram visíveis na presença de IBA mas emergiram logo após sua transferência para meio sem hormônios (Pérez et al. 1985). Em *Digitalis lanata* as plantas enraizadas em meio com hormônio mostraram maior susceptibilidade à doenças, com taxas baixas de sobrevivência, 10 a 60% no período de adaptação (Erdei et al. 1981). Em *Corylus avelana* o aumento da concentração de IBA promoveu a formação de raízes mas também a necrose apical, que foi devida ao período de tempo

que os brotos ficaram em contato com o hormônio (Pérez et al., 1985). Em *Leucaena leucocephala* o IAA induziu à formação de raízes em 100% dos brotos. Com a adição de NAA e IBA as maiores porcentagens de enraizamento foram 69 e 86% respectivamente, mas as raízes formadas eram inadequadas (Dhawan & Bhojwani, 1985).

O agar foi o agente gelificante quase unanimemente usado para todas as espécies e explantes estudados. O gelrite foi usado somente em cultura de *Cephaelis ipecacuanha* (Ideda et al., 1988). Efeitos do agente gelificante foram relatados em *Swartzia madagascariensis* que mostrou maior indução de brotos em meio solidificado com agar e agarose (Berger & Schaffner, 1995). Os autores relacionaram a baixa taxa de indução de brotos observada em meio com gelrite com a hiperidricidade, freqüentemente encontrada quando se usa este agente gelificante (McCown & McCown, 1987).

Estes trabalhos mostram que é possível estabelecer um protocolo eficiente com taxas de estabelecimento de 80 a 100%, para a maioria das culturas estudadas. As medicinais *Madhuca longifolia* (Rout & Das, 1993) e *Trichopus zeylanicus* necessitam de pré-aclimatação que permite atingir taxas de sobrevivência de 70 a 85% , respectivamente, (Krishinan et al., 1995).

A espécie florestal *Ulmus pumila* exige três etapas para que ocorra de 60 a 70% de estabelecimento *in vitro*; onde as plantas novas enraizadas em meio com BA são transferidas para meio sem hormônio e as que não mostraram raízes, para meio com NAA (Corchete et al. 1993).

A *Leucaena leucocephala* mostrou-se mais recalcitrante exigindo um estágio de pré-transplante para se obter apenas 40% de sobrevivência. A pré-transferência se dá em etapas, passando por meio sólido inclinado, onde as raízes são encobertas por meio líquido, com $\frac{1}{4}$ da concentração original de sais de MS, por 4 semanas. Em seguida, os tubos de cultura são destapados e após uma semana as plantas são transferidas para vasos com areia esterilizada e irrigados em dias alternados com solução de Hoagland (Dhawan & Bhojwani, 1985).

2.3.1 Micropropagação da amoreira (*Morus* spp)

A amoreira, *Morus alba* L. é uma árvore de rápido desenvolvimento, de polinização cruzada. A propagação por sementes não conserva o tipo verdadeiro, devido à sua alta heterozigidade (Das, 1983 in: KIM et al., 1985). O número diplóide de cromossomos da maioria das espécies do gênero *Morus* é 28, sendo que algumas altamente poliplóides têm sido encontradas (Kim et al., 1985). Entre os poliplóides, os triplóides têm características desejáveis, tais como, melhor desenvolvimento de ramos e folhas, qualidade nutricional superior e resistência ao frio e doenças (Kim et al., 1985). Entretanto, segundo Das (1983 in: Kim et al., 1985), a produção e multiplicação dos triplóides é demorada. Convencionalmente, a amoreira é propagada por estacas mas alguns genótipos de alto valor nutritivo mostram dificuldades para enraizamento (Jain et al., 1990).

A cultura de tecidos via propagação clonal fornece uma alternativa à propagação vegetativa de espécies lenhosas com características desejáveis (Biondi & Thorpe, 1982; Thorpe 1983). O primeiro trabalho de cultura de tecidos de amoreira foi desenvolvido por Ohyama em 1970 e a partir desta data, muitas espécies de *Morus* têm sido cultivadas *in vitro* (Yadav et al.,1990). A regeneração *in vitro* da amoreira foi relatada no Japão para várias espécies de *Morus* por Oka & Ohyama (1986); na Índia para *M nigra*, *M.indica*, *M.laevigata* e *M. .alba* por Yadav et al. (1990), Bapat & Rao (1990) Hossain et al. (1992) e Kathiravan et al.,(1995).

Dentre os protocolos de propagação *in vitro*, um deles utiliza ápices foliares e botões axilares como explantes de *Camelia* spp (Nakamura, 1991). No caso da amoreira este é um meio útil para a rápida propagação clonal, produção de plantas livres de doenças e preservação de recursos genéticos.

Os relatos sobre micropropagação da amoreira são principalmente de dois tipos, cultura de calos, induzidas de vários explantes e de órgãos, usando como explante principalmente botões de inverno, ápices foliares e gemas axilares (Oka & Ohyama, 1986). Mhatre et al.(1985) utilizaram botões axilares em meio livre de hormônios para produzir brotos que serviram como fonte dos explantes : folhas, segmentos de ramos e botões axilares. Mais recentemente, Islan et al. (1993) utilizaram brotos jovens excisados de plantas de *M.laevigata* de 12 anos como explante. Enomoto (1987) obteve plantas perfeitas de amoreira partindo de gemas axilares ou apicais transplantadas diretamente em meio MS com BA e a seguir transferidas para meio sem hormônio para enraizamento. Plantas

completas de *M.alba* cv MR₂ foram obtidas a partir de hipocótilos retirados de cultura asséptica oriunda de sementes e subcultivada em meio MS suplementado com BA (0,5mg/l) e IAA (0,5mg/l). A regeneração se deu a partir de calos friáveis em 5 a 6 semanas (Kathiravan et al.,1995).

O meio de cultura mais utilizado para amoreira tem sido o MS (Murashige & Skoog,1962) completo ou não, suplementado ou não por citocininas e/ou auxinas. Oka & Ohyama (1975), realizaram três tipos de experimentos com o objetivo de avaliar meios de cultura adequados à cultura de gemas axilares. No primeiro experimento foram usados ramos de 1,0 a 1,5 cm e de 0,3 a 0,5 cm com uma gema ou a gema isolada. No segundo experimento, utilizaram gemas isoladas, em três estádios de desenvolvimento, e no terceiro experimento foi avaliado o período de desenvolvimento da gema no qual os reguladores de crescimento foram efetivos. Os autores observaram que o meio básico MS suplementado com NAA produziu brotos pequenos, e o suplementado com citocinina BA produziu brotos mais longos. Na indução dos brotos, a citocinina foi efetiva por um período de tempo mais longo que a auxina.

Uma interessante observação feita por Oka & Ohyama (1981) refere-se ao efeito da citocinina BA quando adicionada ao meio de cultura inicial e subculturas. Eles notaram que as folhas inicialmente desenvolvidas em ausência de BA, posteriormente não produziram brotos em qualquer nível do hormônio. Já as folhas inicialmente tratadas com 1mg/l de BA tinham a capacidade de formar brotos derivados da zona transicional entre a nervura principal e o pecíolo. Os autores concluíram que a aplicação de BA antes da excisão da folha (explante) foi essencial para estabelecer

algum *status* favorável à indução de brotos sobre o explante foliar. O nível de BA durante a subcultura do explante excisado também afetou o desenvolvimento do broto. Segundo os autores, isto indica que o BA está envolvido na indução da atividade meristemática e também na diferenciação e alongação dos brotos oriundos deste tecido. Já em 1976, Ohyama & Oka, trabalhando com gema apical haviam observado que o suplemento exógeno de BA e NAA era necessário à morfogênese levando ao desenvolvimento de uma planta completa de amoreira.

Hossain et al. (1992) observaram que a porcentagem máxima de explantes nodais em *M.laevigata*, cultivados em diferentes concentrações de citocinina que produziram parte aérea e ramos mais longos, ocorreu em meio contendo 1mg/l de BA. Porém o número máximo de brotos/explante foi obtido em meio contendo 2,5mg/l de BA. Os mesmos resultados foram observados com *M.nigra* por Yadav et al. (1990).

Jain et al. (1990) trabalhando com quatro espécies de amoreira, *M.indica*, *M.alba*, *M.rotundifolia* e *M.bombycis*, observaram que a resposta à produção de brotos variou com o genótipo. Já Saito (1992) não observou o mesmo resultado quando trabalhou dentro da espécie *M.alba* com as variedades Hayatesakari, Minamisakari e Kenmochi.

Nenhum dos trabalhos consultados sobre micropropagação da amoreira relatou estudos sobre a instabilidade cromossômica em plantas derivadas deste processo (Tabela 5).

Tabela 5 Lista de algumas espécies de amoreira, *Morus* spp, micropropagadas *in vitro*.

ESPÉCIE	TIPO DE EXPLANTE	REFERÊNCIA
<i>M.alba</i>	botões de inverno	OKA & OHYAMA,1973
<i>M.alba</i>	gemas axilares	OKA & OHYAMA,1974
<i>Morus</i> spp	ápices foliares	OHYAMA & OKA,1976
<i>M.alba</i>	ápices foliares	OKA & OHYAMA,1981
<i>M.indica</i>	ápices foliares	MATRE et al.,1985
<i>M.alba</i>	sementes	KIM et al.,1985
<i>Morus</i> spp	gemas de inverno, ápices foliares	OKA & OHYAMA,1986
<i>M.indica</i>	gemas vegetativas	BAPAT et al.,1987
<i>Morus</i> spp	folhas, hipocótilo, gemas e ápices foliares	ENOMOTO, 1987
<i>M.nigra</i>	ápice foliar e segmentos nodais	YADAV et al.,1990
<i>Morus</i> spp	botões axilares	JAIN et al.,1990
<i>M.indica</i>	botões axilares	BAPAT & RAO,1990
<i>M.laevigata</i>	ramos jovens	HOSSAIN et al.,1992
<i>M.alba</i>	folhas, gemas de inverno	SAITO,1992
<i>Morus</i> spp	brotos jovens	ISLAN et al.,1993
<i>M.alba</i>	hipocótilo	KATHIRAVAN et al.,1995

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Macrosporogênese e Microsporogênese de *Morus alba* 1.

O material biológico usado no presente estudo foi coletado no campo de introdução do Centro Estadual de Pesquisa Aplicada a Sericicultura (CEPAS) no município de Gália, pertencente ao Instituto de Zootecnia, Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, SP.

No estudo da morfologia floral, macrosporogênese e microsporogênese da amoreira *Morus alba* L. , foram utilizados clones oriundos do programa de melhoramento da amoreira do Instituto de Zootecnia (Fonseca et al., 1985a,b).

Nos anos de 1991,1992 e 1993, foram coletadas flores dos clones Catânia Paulista e Formosa e do clone melhorado IZ 56/4 (Figura 3). Em 1994 foram coletadas flores dos clones IZ 15/1 e IZ15/7 (Figura 4) oriundos do cruzamento entre os clones Calabresa e Nezumigaeshi, (Tabela 6, Figura 5).

As flores foram coletadas em vários estádios de desenvolvimento do início ao fim do florescimento. Foram realizadas coletas em quatro anos, sendo nos tres primeiros (1991, 1992, 1993) das 9

Figura 3 - Ramos dos clones Formosa, Catânia Paulista e IZ 56/4, de *Morus alba* L., da coleção do CEPAS, Gália, SP

Figura 4- Ramos dos clones IZ15/1 e IZ15/7 , de *Morus alba* L., da coleção do CEPAS, Gália, SP

Tabela 6 - Características morfológicas e de produção dos clones IZ15/1 e IZ15/7 e seus progenitores Calabresa e Nezumigaeshi, *M.alba* L.

Características	Calabresa	Nezumigaeshi	IZ 15/1	IZ 15/7
Sexo da planta	feminina	masculina	feminina	masculino
FOLHA:				
Comprimento	18,2	15,7	19,0	16,7
Largura	13,2	13,6	16,3	12,0
Formato	pentalobada	geralmente pentalobada	pentalobada	inteira ovada
Cor	-	-	verde escura	verde clara
Superfície	plana	plana	plana	plana
Pecíolo	5,2	5,2	5,0	5,6
RAMO:				
Cor	marrom escuro acinzentado	amarelo claro acinzentado	marrom escuro acinzentado	marrom esverdeado acinzentado
Gema	pequena	pequena curta	grande	pequena
Reprodução Vegetativa	Sim	Não	Sim	Sim
DADOS POR METRO DE RAMO				
Número de folhas	26	47	25	26
Peso de folhas(PF)	79,0	166,0	93,7	63,3
Peso de ramos (PR)	33,5	65,1	52,1	34,6
Peso médio de folhas	3,04	3,54	3,74	2,43
Relação PF/PR	2,36	2,55	1,80	1,83
Comprimento de internódios	3,8	2,1	4,0	3,8
Produção de folhas em relação ao padrão Calabresa	100%	-	136%	108%

(Fonte: Fonseca et al., 1985a,b; 1987a,b)

Figura 5 - Ramos dos clones Calabresa e Nezumigaeshi , de *Morus alba* L., da coleção do CEPAS, Gália, SP

as 11 horas da manhã e no ano de 1994 a coleta feita durante três dias seguidos das 5h30 às 22h30, com intervalos de 1 hora. Após coleta, as flores eram imediatamente fixadas em solução de Carnoy (3 partes de álcool etílico absoluto e 1 parte de ácido acético glacial), por 24 horas. Após a fixação, as flores foram transferidas para solução de álcool à 70%, sendo armazenadas em refrigerador por tempo indeterminado.

As flores dos dois sexos, assim acondicionadas, foram então utilizadas para o preparo de dois tipos de lâminas permanentes:

a) Inicialmente, para os clones Catânia Paulista, Formosa, IZ 56/4 e IZ15/1, utilizou-se o método de inclusão em parafina para seccionamento em micrótomo e montagem em cortes sequenciais sobre lâminas untadas com adesivo de Haupt. A parafina era removida por imersão da lâmina em xilol puro, permanecendo assim, somente as secções das flores. A seguir, foram coradas com hematoxilina férrica de Heindenhein e cobertas com lamínula após aplicação de fina camada de bálsamo do Canadá, obtendo-se assim, as lâminas permanentes. Este método teve como objetivo permitir, além da observação das células germinativas, a análise da estrutura floral.

b) Posteriormente foi utilizado o método de *smear* (esmagamento) para observação da microsporogênese nas flores masculinas do clone IZ 15/7. Neste método, as anteras são esmagadas em corante (carmim propiônico a 2%), cobertas com lamínula e observadas ao microscópio. As lâminas que continham figuras meióticas foram imersas em solução de ácido acético 45% para separação de lâmina e lamínula, as quais depois de secas ao ar foram montadas em bálsamo do Canadá, obtendo-se assim, duas lâminas

permanentes. Este método destrói o tecido mas permite uma visualização de células inteiras e isoladas além de ser eficiente e rápido para o estudo das figuras meióticas masculinas.

As figuras meióticas foram fotografadas em microscópio Olympus BH-2 , com optovar 1,25X. Foi utilizado o filme Agfa Copex-pan, com filtro verde, para as lâminas de *smear*, e o filme Kodak T-Max, sem filtro, para as lâminas de corte em parafina.

3.1.1 Medidas das inflorescências

Com o intuito de caracterizar as inflorescências da amoreira, foram feitas medidas e contagens das flores nos clones Catânia Paulista, Formosa e IZ56/4; Nezumigaeshi, Calabresa, IZ15/1 e IZ15/7.

As inflorescências utilizadas continham flores já no estadio final de desenvolvimento, ou seja, as flores masculinas abertas e as femininas maduras.

As contagens e medidas não foram feitas sempre sobre as mesmas inflorescências, uma vez que nem sempre elas estavam completas, impedindo a sua contagem mas não a sua medida, razão pela qual o tamanho das amostras é diferente. Somente no clone Catânia Paulista as contagens e medidas puderam ser feitas sobre a mesma inflorescência e assim foram utilizadas para uma estimativa da correlação entre tamanho de inflorescência e número de flores nela contida.

3.2 Micropropagação

3.2.1 Material

O material vegetal utilizado para o estabelecimento de um protocolo visando a introdução *in vitro* de brotos apicais de amoreira foi o clone híbrido IZ 56/4 (Figura 6), oriundo do programa de melhoramento da amoreira conduzido pelo Instituto de Zootecnia (IZ) pertencente à Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo (Fonseca et al. 1985b, 1994). O clone IZ 56/4 é fruto do cruzamento entre as variedades Formosa (progenitor feminino) e Catânia Paulista (progenitor masculino) (Tabela 7).

A variedade Catânia Paulista (*Morus alba* L.), possui características semelhantes às variedades Catânia 1 e 2 , importadas das Itália, daí a origem do nome. É precoce, produtiva e vigorosa mas não se reproduz bem por estaquia. A variedade Formosa (*M.alba* L.) é originária da Ilha de Formosa. É bem aclimatada, precoce, produtiva, vigorosa e reproduz-se bem por estaquia (Fonseca et al 1985a).

3.2.2 Estabelecimento da amoreira *in vitro*

Explante: . Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos, do Departamento de Genética da ESALQ/USP. Foram usados como explantes ápices foliares excisados de estacas cultivadas em caixas

Figura 6 - Vista parcial da parcela do clone IZ56/4 , de *Morus alba* L., no CEPAS, Gália, SP

Tabela 7 - Características morfológicas e de produção do clone IZ 56/4 e seus progenitores Formosa e Catânia Paulista, *M.alba* L.

Características	Formosa	Catânia Paulista	IZ 56/4
Sexo da planta	feminina	masculina	monóica
FOLHA:			
Comprimento	21,1 cm	18,0 cm	20,6 cm
Largura	16,1 cm	14,0 cm	16,7 cm
Formato	Inteira	Inteira	Inteira
Cor			verde-clara
Superfície	plana	ondulada	ondulada
Pecíolo	5,4 cm	6,7 cm	5,6 cm
RAMO			
Cor	marrom-escuro	marrom-esbranquiçado	verde-claro acinzentado
Reprodução vegetativa	estaquia	enxertia	estaquia
DADOS/METRO DE RAMO:			
Número de folhas	24	25	23
Peso de folhas (PF)	112 g	136 g	97,5 g
Peso de ramos (PR)	41,5 g	61,8 g	49,4 g
Peso médio de folhas	4,66 g	5,44 g	4,24 g
Relação PF/PR	2,70	2,20	1,97
Comprimento dos internódios	4,2 cm	4,00 cm	4,30 cm
Relação de Produção de folhas em relação a padrão cClabresa	100%	-	166,90%

Fonte: Fonseca et al., 1985a,b; 1987a,b

com areia colocados em telado e em canteiros de casa de vegetação (Figura 7). Após a excisão os ápices foram colocados em becker com água

Desinfecção: Os explantes foram lavados em água contendo 1% de detergente comercial e então deixados em água corrente por 10 minutos. Em seguida, os explantes foram esterilizados em solução desinfetante (Tabela 8) por 11 a 15 minutos após passagem em álcool 70% (v/v) por 40

segundos, seguindo-se lavagem cuidadosa com água destilada esterilizada por 5 a 6 vezes.

Figura 7 - Vista do canteiro de estacas do clone IZ 56/4 (*M.alba* L.) em casa de vegetação no Dpto. de Genética, ESALQ/USP, Piracicaba, SP..

Tabela 8 - Solução de desinfecção utilizada para ápices foliares de amoreira (*M.alba* L.):

Componentes	Dosagem por 100 ml
NaOCl 2 %	16,6 ml
Movadol (Cloreto de benzalconio)	0,1 ml
Tween®80	1 gota
H2O destilada	até completar 100 ml

Meio de Cultura: O meio de cultura utilizado foi de Murashige & Skoog (1962) contendo metade da concentração original dos macro e micro elementos e vitaminas (MS/2) suplementado com 15 g l^{-1} de sacarose. O pH do meio foi acertado para 5,8, com 0,1N NaOH / 0,1N HCl, antes da adição do agente gelificante (Phytigel, Sigma, a $1,8 \text{ g l}^{-1}$), e esterilizado em autoclave à 120°C durante 20 minutos.

Após a autoclavagem foi adicionado o antibiótico tetraciclina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) microfiltrado ($0,2 \mu\text{m}$).

Cultura: Os ápices foliares desinfetados sofreram excisão das folhas, deixando-se somente as folhas da gema apical, ficando com um tamanho médio de 2,5 cm com 2 a 3 gemas. Foi inoculado um explante por frasco de $2,5 \times 8,5 \text{ cm}$ (30ml). Após uma a quatro semanas foram subcultivados em meio de enraizamento contendo ácido indol butírico (IBA) ($0,4 \text{ ml/l}$) por 1 ou 2 semanas. Em seguida, foram novamente subcultivados em meio MS/2 livre de hormônio. Também foram testados, em alguns lotes (Tabela 10), um choque com hormônio, com o subcultivo dos ápices por uma semana em IBA a 1%.

Os explantes permaneceram em sala climatizada à temperatura entre 25 e 28°C , fotoperíodo de 16 horas de luz (lâmpada fria) e umidade relativa de 40%.

Ensaio: Os experimentos foram realizados durante os anos de 1994, 1995 e 1996.

Na primeira quinzena de março de 1994, foram colocadas 169 estacas de amoreira do clone IZ56/4 em caixas com terra, em telado, no Departamento de Genética da ESALQ/USP, Piracicaba. Após coleta foram colocados em meio de cultura constituindo 22 ensaios (Tabela 10) .

Na segunda quinzena de maio de 1995, foram colocadas estacas de amoreira do clone IZ56/4, sendo 113 em caixas com areia e 54 diretamente no solo, em casa de vegetação. Foram coletados e inoculados em meio de cultura 12 ensaios (Tabela 12).

Na primeira quinzena de março de 1996, foram colocadas 50 estacas de amoreira do clone IZ56/4 no telado. Foram coletadas e colocados em meio de cultura mais dois lotes de ápices visando a produção e coleta de raízes para estudos dos cromossomos .

3.3 Estudo de cromossomos mitóticos

As raízes induzidas *in vitro* foram coletadas com cerca de 2cm e pré-tratadas com agentes inibidores do fuso mitótico (8-hidroxiquinolina 0,03%; colchicina 0,01% e 0,05%) e/ou inibidores de síntese protéica (cicloheximidina 140ppm) (Tabelas 11, 13, 15). Após o pré-tratamento, as raízes foram fixadas em solução de Carnoy (etanol : ácido acético, 3:1) por 24 horas e mantidas em álcool 70% (v/v) por tempo indeterminado a 10°C.

Para coloração foi utilizada a metodologia de Feulgen com hidrólise de 5 minutos em HCl 1N à 60°C, seguida de tratamento em reativo de Schiff (fucsina-leuco-básica) por 45 minutos. As raízes foram lavadas em água destilada por 5 minutos e esmagadas em carmim acético 2%. As lâminas consideradas satisfatórias foram separadas das lamínulas em ácido acético 45%, secas ao ar e montadas em bálsamo do Canadá.

As figuras mitóticas foram fotografadas em microscópio Olympus BH-2, com optovar 1,25X, utilizando-se filme Agfa Copex-pan e filtro Olympus verde, no Departamento de Genética da ESALQ/USP

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Morfologia Floral e Estrutura da Raiz

4.1.1 Morfologia Floral

A literatura registra a amoreira, *Morus* spp, como uma planta perene, com cultivares apresentando inflorescências na maioria monossexuais e umas poucas bissexuais (O.T.C.A.,1971; Raswagami et al.,1976; Ting-Zing et al., 1988). As flores da amoreira são pequenas e sésseis, reunidas em uma inflorescência chamada amentilho (Figura 8)

Figura 8 - Esquema típico das inflorescências masculinas e femininas da amoreira, *Morus* spp (Ting-Zing et al.,1988)

Observando-se as inflorescências dos clones utilizados no presente ensaio estimou-se o número de flores por amentilho e seu comprimento para Catânia Paulista, Formosa e sua F1 IZ56/4 e para Nezumigaeshi, Calabresa e suas F1s IZ15/1 e IZ15/7 conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 : Características florais dos clones de amoreira utilizados .

CLONES	Tipos de flores	Contagem de flores		Tamanho de inflorescências	
		Número de inflorescências contadas	Número médio de flores por inflorescência	Número de inflorescências medidas	Comprimento médio da inflorescência (cm)
Catânia Paulista	m	90	35	90	3,0
Formosa	f	90	31	80	1,6
IZ 56/4	m , f	100	31	80m/30f	3,5/2,0
Nezumigaeshi	m	97	34	92	2,3
Calabresa	f	100	37	28	1,5
IZ 15/1	f	60	40	-	-
IZ 15/7	m	100	39	90	3,1

m = inflorescência masculina ; f = inflorescência feminina ; - não determinado

Os dados da Tabela 9 sugerem que existem diferenças entre os clones em relação às flores e entre às inflorescências masculinas e femininas, o que concorda com o único relato sobre dados florais em várias espécies de amoreira (Rangaswami et al.,1976). Neste trabalho, os autores observaram que o amentilho masculino é usualmente maior que o feminino medindo de 2,5 a 5,0cm de comprimento e que o feminino mede de 1,5 a 3,5cm. Os autores registram, entretanto, que o amentilho feminino de certas espécies como *M.serrata* e *M.laevigata* medem de 10 a 12cm. A literatura

registra somente um dado geral de 20 a 40 flores por amentilho (O.T.C.A.,1971).

A análise estatística realizada com os dados de 90 inflorescências de Catânia Paulista mostrou um $R=0,53^{**}$, indicando que existe correlação positiva entre o tamanho da inflorescência e o número de flores nela contido.

Para o estudo da macrosporogênese e microsporogênese, os botões florais foram coletados em vários estádios de desenvolvimento. Inicialmente, foram preparadas lâminas pelo método de inclusão em parafina. Para este estudo foram utilizadas 543 flores do clone Catânia Paulista; 281 flores do clone Formosa e 406 flores do clone IZ56/4. Todas as flores do clone Catânia Paulista se revelaram masculinas, mas no clone Formosa, apareceram 0,71% de flores hermafroditas sendo as restantes femininas. No clone IZ56/4 foram identificadas 51,72% de flores masculinas, 43,60% de flores femininas e 4,68% de flores hermafroditas.

Uma vez determinado o tamanho das flores, nas quais as figuras meióticas eram visíveis, optou-se por uma mudança na metodologia de coleta das flores (ver Material e Métodos) e pela preparação de lâminas de microsporogênese pelo método de esmagamento. Foram preparadas cerca de 100 lâminas histológicas de flor feminina do clone IZ15/1 e cerca de 500 lâminas de esmagamento de flor masculina do clone IZ15/7. Medidas, no sentido do maior diâmetro, foram feitas em 50 outras flores de cada um dos referidos clones, obtendo-se um valor de $2,10 \pm 0,26$ mm para flor masculina e $1,28 \pm 0,20$ mm para flor feminina.

Dois tipos sexuais foram observados: unissexuais masculinos (Catania Paulista, Nezumigaeshi e IZ15/7) e femininos (Formosa, Calabresa e IZ15/1) e um tipo predominantemente masculino (IZ56/4). Estes dados diferem em parte dos obtidos para *M.alba*, por Gill & Gupta (1979) que revelaram também a existência de dois tipos sexuais, sendo um deles predominantemente masculino e, ao contrário dos unissexuais, estes autores encontram o tipo monóico. Nos estudos dos clones observou-se a presença de flores femininas no clone predominantemente masculino IZ56/4, mas não a presença de flores masculinas no clone feminino Formosa o que coincide com o trabalho de Gill & Gupta (1979), mas em ambos os clones foram constatadas a presença de flores hermafroditas

4.1.1.1 A flor feminina

A Figura 9 mostra três esquemas da estrutura típica de uma flor feminina, comum a todos os clones femininos de *M.alba* L. estudados.

As flores femininas consistem de quatro sépalas, ovário, estilo e estigma. As sépalas envolvem completamente o ovário. O ovário é um sincarpo bicarpelado e unilocular contendo um único óvulo ligado à margem do ovário. Tem um único estilo cujo comprimento é um caráter importante botanicamente para distinção das várias espécies de amoreira. Esta característica foi utilizada por Koidzume (O.T.C.A.,1971)

Figura 9 - Esquema da estrutura típica da flor feminina da amoreira, *Morus* spp. (a) Corte longitudinal da flor (b) Diagrama floral; (c) Aspecto da flor feminina (Rangaswami et al., 1976)

para a classificação da amoreira. No topo do estilo está o estigma, que se divide e assume o aspecto de chifre (O.T.C.A., 1971; Rangaswami et al., 1976; Ting-Zing et al., 1988).

As fotos apresentadas na Figura 10 são lâminas obtidas pelo método de corte das flores femininas e hermafroditas dos clones Formosa e IZ 56/4, respectivamente.

Nas observações das lâminas de flores femininas conseguiu-se registrar somente as figuras meióticas da formação inicial da Célula-Mãe-do-Saco-Embrionário (CMSE) e do Saco Embrionário (SE) apresentando os 8 núcleos finais (Figura 17).

Figura 10 - (a) = Corte longitudinal da flor feminina do clone Formosa, *M.alba* L. Observa-se o óvulo, em cujo interior localiza-se o saco embrionário.
(b) Corte longitudinal de flor hermafrodita do clone IZ56/4, *M.alba* L. Observa-se o óvulo e os sacos polínicos nas anteras.
Escala : (a)= 50 μ m ; (b) = 150 μ m.

A estratégia de coleta de flores no campo foi mudada aumentando-se o período e reduzindo-se os intervalos de coleta uma vez que as primeiras coletas não permitiram a observação das figuras meióticas. Como a safra de flores dos clones Formosa e IZ56/4 já havia acabado (setembro/1994) optou-se pela coleta de um novo clone, o IZ15/1 irmão germano do IZ15/7. Foram preparadas 500 lâminas de cortes, e foi possível observar a CMSE (Figura 16) e megásporos.

A dificuldade em se obter sucesso no estudo das fases da macrosporogênese é evidenciada pela ausência de trabalhos na literatura, e parece estar associada à velocidade de divisão e a impossibilidade de se utilizar o método de preparação de lâminas que proporcione maior rendimento na obtenção das figuras meióticas.

4.1.1.2 A flor masculina

Figura 11 - Esquema típico da flor masculina da amoreira, *Morus* spp.

(a) corte longitudinal observando-se a inserção dos estames; (b) diagrama floral; (c) esquema da flor masculina com suas quatro sépalas e quatro estames (Rangaswami et al., 1976).

A Figura 11 mostra três esquemas da estrutura típica de uma flor masculina da amoreira, comum a todos os clones masculinos de *M.alba* L. estudados.

As flores masculinas são compostas de quatro sépalas e quatro estames. O estame é composto de um filete com duas anteras e duas lojas cada uma.

Nos cortes histológicos das flores masculinas as anteras não ficam em perfeito posicionamento por serem presas a um filamento fazendo com que sua posição seja variável, mesmo na flor ainda fechada. Em poucas lâminas, foi possível observar algumas Célula Mãe do Grão de Pólen (CMGP) em divisão e fotos da estrutura da flor puderam ser obtidas (Figura 12).

Para a obtenção das figuras meióticas adotou-se o método de esmagamento, uma vez que a amoreira tem grande produção de pólen e este método permite melhor visualização de células isoladas. Após o manuseio de cerca de 500 flores pôde-se obter 10 lâminas, contendo todas as figuras meióticas. Isto representa um aproveitamento de 2% das preparações citológicas; este baixo rendimento dificulta a análise da divisão meiótica masculina em amoreira.

Figura 12 - Cortes transversais da flor masculina do clone Catânia Paulista (*M.alba* L.) mostrando a antera bilobada e tetraloculada (a) e com CMGP em prófase(b). Escalas : (a) = 100µm ; (b) = 20µm .

4.1.2 Estrutura da Raiz

Em virtude do pequeno número de métases observadas nas preparações de lâminas de raiz, foram realizados cortes da ponta da raiz do clone IZ 56/4 em parafina visando observar o tamanho e posição da região meristemática.

O sistema radicular da amoreira consiste de uma raiz principal, raízes laterais e raízes fibrosas cuja forma varia com o método de propagação utilizado (Ting Zing. et al.,1988)

A semente dá origem a uma raiz principal da qual saem as raízes laterais que se ramificam em pequenas raízes fibrosas. As raízes originadas da enxertia, estaquia ou calos, são chamadas raízes adventícias, e neste caso não existe uma raiz principal e o sistema radicular é irregular.

A ponta da raiz compreende quatro regiões (Figura 13): coifa (a), região meristemática (b), região de alongamento (c) e região dos pelos absorventes (d) (Shimoya,1966). A região meristemática (Figura 14) é localizada logo acima da coifa, suas células minúsculas com grandes núcleos e paredes finas são compactamente arranjas e dividem-se continuamente (Ting-Zing et al.,1988).

Figura 13 - Estrutura da raiz da amoreira, *Morus* spp. (TING-ZING et al., 1988) onde observa-se a localização da região meristemática logo acima da coifa.

1 - Lenho primário, 2 - Lenho secundário, 3- Medula, 4- Pelos absorventes, 5- Epiderme, 6- Parenquima cortical, 7- Endoderme, 8- Periciclo, 9- Pró-câmbio

Figura 14 - Corte longitudinal (a) da ponta da raiz do clone IZ56/4 (*M.alba* L.), produzida *in vitro*.

Corte transversal (b) na região meristemática da raiz do clone IZ56/4 (*M.alba* L.), produzida *in vitro*, podendo-se, por comparação com o esquema da Figura 13, observar a posição da região meristemática.

Escalas = 20 μ m.

4.2 Gametogênese

4.2.1 Macrosporogênese

Na Figura 15 pode-se observar a inflorescência feminina do clone Formosa utilizada para os estudos da macrosporogênese, mostrando um ápice floral com 3 inflorescências, uma inflorescência isolada e uma flor feminina isolada.

Figura 15 - Inflorescência feminina ampliada do clone Formosa (*M.alba* L.). Da esquerda para a direita, ápice floral com várias inflorescências; inflorescência isolada; flor feminina isolada. Escala : 1:2,1.

A literatura internacional não traz estudos referentes à gametogênese feminina da amoreira. Talvez a morfologia da flor explique esta falta de estudos uma vez que, em condições normais, ela contém apenas

um óvulo e, conseqüentemente, apenas uma Célula-Mãe-do-Saco-Embrionário (CMSE). Isto torna difícil e trabalhosa a obtenção de figuras em divisão, havendo necessidade do preparo de centenas de lâminas, o que já é difícil mesmo em espécies com ovários com vários carpelos como a seringueira (CUCO,1992).

No presente estudo, foi possível observar a formação da CMSE (Figura 16) e do SE (Figura 17) . A Figura 17 mostra o saco embrionário com os oito núcleos normais da espécie, o que sugere uma divisão meiótica normal no clone IZ56/4.

Figura 16 - Corte transversal de flor feminina do clone IZ15/1 (*M.alba* L.) com CMSE em início de prófase I. Escala = 10μm.

Na literatura, algum comentário sobre o início e final da macrosporogênese em algumas espécies de *Morus* pode ser encontrado em

Figura 17 - Cortes longitudinais da flor feminina do clone IZ56/4 (*M.alba* L.), onde observa-se o saco embrionário octanucleado. (a) e (b) um núcleo; (c), (d) e (e) dois núcleos. Nota: Os oitos núcleos foram observados em cortes diferentes. A escala corresponde à 10 μ m.

Rangaswami et al. (1976) e em um estudo baseado em desenhos de Datta (1954) com *M.indica* Linn. e *M.laevigata* Wallich.

Segundo Rangaswami et al.(1976) o óvulo surge como um crescimento diferenciado das células mãe do mamelão. O megásporo sofre uma primeira divisão heterotípica formando uma díada que sofre uma segunda divisão, homeotípica, dando origem a uma tétrade linear na qual somente a menor forma o SE uninucleado enquanto as demais degeneram.

4.2.2 Microsporogênese

Na Figura 18 observa-se a inflorescência masculina do clone Catânia Paulista (*M.alba* L.) em dois estádios de desenvolvimento, antes e após a antese e uma flor masculina isolada.

A gametogênese masculina, definida como microsporogênese, é o processo de formação do grão de pólen. Este processo ocorre nas anteras, parte dos estames que contém os grãos de pólen.

No início a antera é uma massa de células, sendo que três células epidermais dividem-se periclinalmente dando origem às células primárias. As células primárias dividem-se repetidamente formando a camada nutritiva chamada *tapetum* que é inicialmente uninucleada e depois torna-se multinucleada. As células esporângias primárias dividem-se um certo número de vezes e formam as Células-Mãe-do-Grão-de-Pólen (CMGP) (Rangaswami et al.1976).

Figura 18 - Inflorescência masculina ampliada do clone Catânia Paulista (*M.alba* L.). Da esquerda para direita temos, inflorescência antes da antese; inflorescência após a antese; flor masculina isolada. Escala : 1:2,4.

O desenvolvimento da antera pode ser dividido em duas fases gerais. Na primeira fase, é estabelecida a morfologia da antera, ocorrendo a diferenciação das células e tecidos, e a CMGP sofre divisão meiótica (microsporogênese). Na segunda fase, com o grão-de-pólen já diferenciado, as anteras aumentam de volume e são empurradas para fora da flor pelo filamento, ocorrendo a degeneração do tecido, deiscência e liberação do grão de pólen (Goldberg et al.1993).

Nenhuma irregularidade da microsporogênese foi observada no presente trabalho, o que concorda com os dados de Datta (1954) que fez um estudo citogenético em *M.indica* ($2n = 2x + 28$) e também na poliplóide

M.laevigata ($2n = 4x = 56$) e com os dados de Basavaiah et al. (1989, 1990) trabalhando com as poliplóides *M.serrata* ($2n = 6x = 84$) e *M.nigra* ($2n = 22x = 308$).

Apesar do grande número de células que podiam ser observadas em prófase I foi difícil a perfeita visualização dos cromossomos. Entretanto, foi a fase mais freqüente, talvez por ser, segundo alguns autores, a mais prolongada da meiose. Swanson et al. (1981) faz uma comparação entre a duração da prófase mitótica e prófase I da meiose em lírio em 30 a 60 minutos e 4 a 6 dias respectivamente, e De Robertis et al. (1977) vão mais além colocando que, embora o leptóteno e o zigóteno durem poucas horas, o paquíteno pode durar de dias a vários anos.

Na Figura 19, são mostradas as subfases da prófase I da amoreira (*M.alba* L.), leptóteno (a), zigóteno (b), paquíteno (c), diplóteno (d) e diacinese (e), respectivamente.

Observa-se que no início da prófase os cromossomos estão bem distendidos, claros, característicos do leptóteno (Figura 19a), ou seja, na “fase de fios finos”, e vão se compactando, tornando-se mais nítidos. Os cromossomos apresentam uma série de cromômeros que vão se tornando indistintos com o aumento do grau de compactação do cromossomo.

No zigóteno (Figura 19b), fase em que ocorre o pareamento ou sinapse, os cromossomos já se apresentam mais corados podendo ser visualizado o pareamento entre eles.

Na Figura 19c, observa-se um paquíteno bem característico, com os cromossomos mais compactados e corados. Nesta fase, se dá a formação do complexo sinaptonêmico cuja dissolução coincide com o

Figura 19 - CMGP do clone IZ15/7 (*M.alba* L.) em prófase: (a) leptóteno; (b) zigóteno; (c) paquíteno; (d) diplóteno, onde se observa um par de cromossomos grandes ($\rightarrow$) e um par de cromossomos ligado ao nucléolo ($\uparrow$), e (e) diacinese, onde observa-se uma formação de cromossomos que sugere ser um tetravalente em anel ($\rightarrow$). Escalas = 5 μ m

início do diplóteno (Figura 19d). Nesta fase tornam-se mais nítidos um ou dois cromossomos mais intensamente corados, talvez representando aqui os cromossomos grandes relatados por Sinotô, já em 1929.

A Figura 19c, mostra o final da prófase I, ou seja, a diacinese, podendo-se distinguir 12 bivalentes e um tetravalente em anel. São, portanto, 28 cromossomos, típicos da espécie.

Estas figuras se assemelham aos resultados já relatados na literatura. Rangaswami et al (1976) observaram que na diacinese usualmente são formados tetravalentes em anel com dois quiasmas terminais e os demais cromossomos em forma de bastão com um quiasma terminal. Estes autores observaram também que dois bivalentes ligados ao nucléolo, à semelhança do que se observa na Figura 19d. Basavaiah et al.(1989), observaram em *M.serrata* ($2n = 6x = 84$), 42 bivalentes na diacinese, sendo que na maioria das células dois a três bivalentes estavam associados ao nucléolo.

A Figura 20a, traz a metáfase I em vista lateral. É nesta fase que ocorre a máxima compactação dos cromossomos e pode-se observar o tamanho reduzido devido ao alto nível de espiralização.

Na prófase I ainda não foi possível distinguir grandes diferenças no tamanho dos cromossomos, entretanto, na metáfase I (Figura 20a) pode-se observar algumas diferenças de tamanho e coloração no conjunto cromossômico, à exemplo dos relatos de Datta (1954) que encontrou extrema diferença no tamanho entre os cromossomos, com dois deles bem maiores que os demais.

A anáfase I (Figuras 20b, c, d) é a fase seguinte à metáfase e nela ocorre a separação dos pares de cromossomos, indo para cada polo um cromossomo composto de duas cromátides, unidas pelo centrômero.

Ao contrário da prófase I, a metáfase I e a anáfase I são fases rápidas. Nenhuma irregularidade foi observada neste estudo, concordando com os trabalhos de Basavaiah et al. (1989) que, trabalhando com espécies poliplóide, (*M.serrata* - 4x), não encontraram nenhuma irregularidade na separação dos cromossomos durante a anáfase, e como Basavaiah et al. (1990) que trabalhando com uma espécie 22x (*M.nigra*) observaram eventualmente o aparecimento de cromossomos retardatários ou *laggards*.

A fase seguinte, a telófase I, marca o final da primeira divisão meiótica. Ao final da primeira divisão meiótica, as membranas nucleares se refazem ao redor dos 2 núcleos filhos e inicia-se a segunda divisão, ou divisão equacional, com a separação das cromátides irmãs durante a anáfase II.

Segundo Alberts et al. (1993) a prófase II é rápida em todos os organismos, nela os cromossomos podem ser vistos ainda desorganizados (Figura 21a), sem que tenha havido a divisão do citoplasma (citocinese).

O início da separação das cromátides (anáfase II) pode ser vista na Figura 21b, e seu término na Figura 21c.

A Figura 21d mostra uma telófase II contendo 4 núcleos haplóides.

Figura 20 - CMPG do clone IZ15/7 (M.alba L.): (a) metáfase I - vista lateral; (b) início de anáfase I - vista lateral; (c) final de anáfase I; (d) final de anáfase I. Escalas = 5 μ m

Figura 21 - CMGP do clone IZ15/7 (*M.alba* L.):

(a) em prófase II, (b) em início de anáfase II, (c) em final de anáfase II,
(d)Tétrades em telofase II.

Escalas = 5µm.

Durante a busca de figuras meióticas foram observadas algumas células que sugerem estar em citomixia, ou seja, os núcleos filhos ficam juntos numa mesma célula (Figura 22). A Figura em questão, mostra algumas células do clone diplóide IZ15/7 em fase imediatamente após a meiose. O evento contraria os dois postulados de Levan (1941) que diz que a ocorrência é geralmente associada a triplóides e haplóides, etc., em início de meiose.

Figura 22 - Três microsporócitos mostrando citomixia (*M.alba* L.).
Escala = 5 μ m.

4.3 Micropropagação

Ensaio conduzidos no ano de 1994

Na Tabela 10 encontra-se um resumo dos os 22 ensaios realizados com ápices de amoreira, *Morus alba* L., retirados de estacas plantadas no início de 1994. Pode-se observar que houve perda de material, tendo como conseqüência a baixa produção de raízes, mesmo nas plântulas que sobreviveram.

Várias alternativas foram avaliadas para controlar a oxidação do meio que dificultava a sobrevivência e produção de raízes pelo explante, além da contaminação bacteriana. Para controlar a oxidação, primeiramente, tentou-se manipular os explantes, a cada troca para meio fresco, em solução de ácido ascórbico ($0,1\text{mg l}^{-1}$) (Tabela 10, ensaio 09). Entretanto, nenhuma resposta positiva foi possível devido à alta contaminação verificada nas subculturas. Para controlar a contaminação foram realizadas duas pulverizações das estacas fornecedoras de ápices com Dithane (2g l^{-1}) 7 dias antes e, no dia anterior, à coleta dos ápices (Tabela 10, ensaio 17). Este tratamento também foi desfavorável pois revelou-se tóxico aos explantes que morreram em poucos dias .

Estes dados preliminares também permitiram concluir que a amoreira não responde diferentemente à presença do hormônio de enraizamento no meio de cultura, indicando que o conteúdo endógeno é suficiente para a indução de raízes.

Tabela 10 - Produção *in vitro* de raízes a partir de ápices foliares do clone IZ56/4 de amoreira (*M.alba* L.) cultivados durante 60 dias, *in vitro*.

En-saio	Data de Inoculação	Número de explantes	Perda de explantes (%)a/	Produção de raízes (%)b/	Período de IBA no meio	Observações
01	11/05/94	12	8	13	15 dias	
02	20/05/94	14	30	43	IAA *	
03	31/05/94	21	40	33	15 dias*	
04	10/06/94	19	60	5	15 dias	
05	17/06/94	7	40	28	15 dias	
06	24/06/94	15	65	20	15 dias*	
07	08/07/94	26	15	7,7	15 dias	
08	22/07/94	28	35	39	21 dias	
09	05/08/94	39	25	33	21 dias	lavagem em ac. ascórbico
10	12/08/94	10	50	10	21 dias	
11	18/08/94	21	10	19	*	
12	31/08/94	79	25	75	---	sem IBA
13	09/09/94	50	15	34	---	sem IBA
14	23/09/94	88	15	36	---	sem IBA
15	30/09/94	58	25	35	---	sem IBA
16	13/10/94	85	10	34	---	sem IBA
17	30/01/95	76	50	5,3	13 dias	pulverização com Dithane
18	21/02/95	45	10 -65	4,4	15 dias	
19	06/03/95	38	30	21	15 dias	
20	20/03/95	31	15	22,5/6,4	15dias	
21	27/03/95	26	70	0	---	
22	18/04/95	24	50	0	15 dias	

* = Tratamento dos explantes com IBA 1% por 7 dias.

a/ Morte do explantes 15 a 20 dias após plantio por oxidação ou contaminação por bactéria.

b/ % de explantes introduzidos em meio de cultura e que produziram raízes.

As raízes oriundas destes ensaios e apresentando mais de 2 cm foram coletadas e pré-tratadas com 8-hidroxiquinolina 0,03%, em temperatura ambiente, em períodos variados indicados na Tabela 11.

Tabela 11 - Pré-tratamentos usados para raízes de amoreira no ano de 1994/95

Pré-tratamento	Duração (h)	Temperatura
8-hidroxi. ¹	1h00	TA
8-hidroxi.	1h30	TA
8-hidroxi.	2h00	TA
8-hidroxi.	2h30	TA
8-hidroxi.	2h45	TA
8-hidroxi.	3h00	TA
8-hidroxi.	3h30	TA
8-hidroxi.	4h00	TA
8-hidroxi.	6h00	TA
8-hidroxi.	24h00	TA

¹ 8-hidroxiquinolina 0,03% (p/v)

T.A. = temperatura ambiente

Ensaio conduzidos no ano de 1995

Em continuidade aos testes visando o estabelecimento dos ápices foliares da amoreira em meio de cultura e produção de raízes, 12 novos ensaios foram estabelecidos em 1995 (Tabela 12).

Em vista dos resultados obtidos anteriormente, resolveu-se suplementar o meio de cultura com antibiótico. Assim, os explantes foram colocados em MS/2 contendo 0,01% de tetraciclina (p/v). Foram feitas repicagens a cada 7 dias, sendo que na segunda subcultura, foi adicionado também IBA, na qual os ápices permaneceram de 7 (Tabela 12, ensaios 09 e 12) a 15 dias (Tabela 12, ensaios 10 e 11). Pode-se observar que a contaminação média foi de 26% nos ensaios 09, 10 e 11 (Tabela 12) diminuindo sensivelmente para 5% no ensaio 12 (Tabela 12), não diferindo assim dos dados registrados para *Leucaena leucocephala* (Lam.) Wit (Dhawan & Bhojwani, 1985); *Uniola paniculata* L. (Hovanesian & Torres,

1986); *Allium* spp (Rauber & Grunewaldt, 1988) e *Limnanthes* spp. (Reed, 1991).

Nos ensaios 09 e 12 (Tabela 12) observou-se uma alta produção de raízes, com aspecto vigoroso e adequadas aos estudos citológicos. As raízes coletadas nestes ensaios foram pré-tratadas com inibidores de fuso 8-hidroxiquinolina 0,03% e/ou colchicina a 0,01% e 0,05%, isolados ou combinados conforme detalhado na Tabela 13.

Tabela 12 - Produção *in vitro* de raízes a partir de ápices foliares do clone IZ56/4 de amoreira (*M.alba* L.) durante 60 dias *in vitro*.

Ensaios	Data da Inoculação	Número de Explantes	Perda de explantes (%)a/	Produção de raízes (%)b/
01	08/06/95	20	15	35
02	27/06/95	20	5	20
03	05/07/95	29	10	7
04	19/07/95	28	25	0
05	02/08/95	52	100	0
06	09/08/95	15c/	100	0
07	10/08/95	15	100	0
08	16/08/95	30c/	100	0
09	25/09/95	50d/	35	46
10	10/10/95	50e/	20	8
11	07/11/95	50e/	25	1,85
12	28/11/95	41d/	5	46

a/ - morte do explante 15 a 20 dias após plantio por oxidação ou contaminação por bactéria

b/ - % de explantes introduzidos em meio de cultura e que produziram raízes

c/ - os explantes foram coletados às 16h e colocados em água em refrigerador por uma noite.

d/ permanência em meio de enraizamento por 15 dias

e/ permanência em meio de enraizamento por 7 dias

Tabela 13 - Pré-tratamentos usados para raízes de amoreira, (*M.alba* L) no ano de 1995

Pré-tratamentos	Duração (h)	Temperatura
Colchicina 0,01% (p/v) ¹	2h00	TA
Colchicina 0,01% (p/v)	4h00	TA
Colchicina 0,05% (p/v) ²	2h00	TA
Colchicina 0,05% (p/v)	4h00	TA
8-hidroxi ³ . + 10% de colchi ²	1h30	8°C
8-hidroxi. + 10% de colchi	2h00	8°C
8-hidroxi ³ + 10% de colchi ² .	1h00	TA
8-hidroxi. + 10% de colchi.	1h30	TA
8-hidroxi. + 10% de colchi.	2h00	TA
8-hidroxi. + 10% de colchi.	2h45	TA

¹Colchicina 0,01% (p/v); ²Colchicina 0,05% (p/v); ³8-hidroxiquinolina 0,03%(p/v)

T.A. = Temperatura ambiente

Em função destes estudos chegou-se a um protocolo de estabelecimento de ápices foliares de amoreira *in vitro* (Tabela 14) que fornece uma boa produção de raízes (Figura 23).

Tabela 14 - Protocolo de estabelecimento *in vitro* de ápices de amoreira (*M.alba* L.)

01 Coleta dos Explantes	
02. Coleta dos ápices foliares em água	
03. Desinfecção	Lavagem dos explantes em uma solução detergente a 1%; Lavagem em água corrente por 10 minutos.
04. Desinfecção no fluxo laminar	Imersão dos explantes em álcool 70% (v/v) durante 40 segundos; Imersão dos explantes em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl 2%) + Movadol (0,1%) + Tween (0,02%) durante 12 minutos; Lavagem em água destilada autoclavada 5 a 6 vezes.
05. Cultura	Cultura dos explantes em meio MS/2 + Tetraciclina (0,01%) durante 7 dias; Repicagem em MS/2 + Tetraciclina (0,01%) + IBA (0,04%) durante 15 dias; Repicagem em MS/2 + Tetraciclina (0,01%) a cada 15 dias.

Este protocolo assemelha-se aos obtidos por alguns pesquisadores. Krishinan & Seeni (1994) observaram que o severo efeito de exudados nos explantes de *Woodfordia fruticosa* podia ser sensivelmente reduzido com três trocas sucessivas, a cada três dias, do meio de cultura. Erdei et al.(1981) obteve 100% de enraizamento em brotos de *Digitalis lanata* quando os mesmos foram transferidos para meio sem auxina, após um período de 7 a 10 dias em meio contendo IBA. Krishina et al.(1995) observaram que o enraizamento foi acelerado em brotos de *Trichopus zeylanicus* quando eram feitas trocas para meio de cultura fresco a cada duas semanas.

Figura 23 - Produção *in vitro* de raízes do clone IZ56/4 (*M.alba* L.)

Ensaio conduzidos no ano de 1996

Novos ensaios foram estabelecidos no ano de 1996 seguindo o protocolo definido na Tabela 14, visando novos pré-tratamentos das raízes que possibilitassem uma melhora na morfologia dos cromossomos mitóticos. Foram realizados dois ensaios com explantes excisados de estacas do clone IZ56/4, plantadas no início de 1996, e cujas raízes produzidas foram pré-tratadas com o inibidor de síntese protéica cicloheximida (140ppm) isoladamente ou combinado com o inibidor de fuso 8-hidroxiquinolina 0,06% (Tabela 15)

Tabela 15 - Pré-tratamentos usados nas raízes de amoreira (*M.alba* L.) no ano de 1996

Pré-tratamentos	Duração (h)	Temperatura
cicloheximida (140ppm) (p/v)	1h45	TA
8-hidroxi. ¹ + ciclo. ² (1:1)	2h00	TA
8-hidroxi. ¹ + ciclo. ² (1:1)	2h45	TA

¹8-hidroxiquinolina (0,06%) (p/v); ²cicloheximida (140ppm) (p/v)

T.A. = Temperatura ambiente

O desenvolvimento das plantas fornecedoras de explantes foi conduzido em casa de vegetação, a exemplo do sugerido por Oka & Ohyama (1986) que consideraram esta prática útil na obtenção de explantes assépticos, uma vez que tecidos de ramos desenvolvidos no campo são infectados com microorganismos, tornando difícil a sua esterilização. Entretanto, esta técnica não impediu este tipo de contaminação, talvez oriunda das freqüentes reproduções vegetativas sofridas pela amoreira no campo. Somente pela adição de antibiótico ao meio de cultura foi possível controlar estas contaminações.

A cultura de tecidos e órgãos com vistas à propagação clonal e seleção tem sido considerada de grande importância para o melhoramento de plantas. Mhatre et al (1985) em trabalho com *M.indica*, demonstraram a possibilidade desta prática para amoreira a partir da cultura de folhas e gemas axilares, com obtenção de 90% de sobrevivência das plântulas após transferência para o solo. Kathiravan et al (1995) obtiveram 65 a 70% de sobrevivência em 500 plântulas enraizadas obtidas a partir de hipocótilo de *M.alba* e transferidas para uma mistura de 1:1 de solo e vermiculita por 4 semanas e 75 a 80% após transferência para o solo.

Em trabalho visando não só a propagação clonal de plantas mas também o estabelecimento de protocolos para a aplicação de metodologias, incluindo a hibridização somática, Dornelas & Vieira (1994) estabeleceram uma rotina de regeneração de plantas férteis a partir da cultura de tecidos, para algumas espécies de *Passiflora* (maracujá). Uma média de 38% dos ápices de maracujá, colocados em meio MS2, produziram raízes após 28 dias de cultura

A micropropagação de plantas ornamentais e frutíferas tem sido amplamente realizada usando como explante brotos terminais. Hughes (1981); Skirvin (1981) e Kim et al. (1985) indicaram este método como potencial à propagação da amoreira.

No presente trabalho, o objetivo principal do estabelecimento dos ápices foliares em meio de cultura foi a formação de raízes com vistas a análises citogenéticas. Segundo Kim et al. (1985), ao contrário da maioria das espécies lenhosas, o enraizamento espontâneo é comum na amoreira, e a indução de raízes é relativamente fácil. Estudos

realizados por estes autores indicam que devem ser usadas baixas concentrações de IBA para a iniciação de raízes, e que altos níveis induzem a formação de calos na base do ramo. Entretanto, no presente trabalho, mesmo usando-se baixa concentração de IBA (0,04%), eventualmente foi constatada a formação de calo na base do ramo (Figura 24).

Figura 24 - Formação de calo na base do ápice em cultura *in vitro* do clone IZ56/4 de amoreira, *M.alba* L.

Diferentes observações em relação aos efeitos da auxina no enraizamento de diversos explantes da amoreira podem ser encontrados na literatura. Visando estabelecer um método eficiente de propagação de germoplasma da amoreira, pelo uso da cultura *in vitro* de gemas isoladas, Enomoto (1987) observou que a preservação foi adequada em condições

livres de hormônios. Jain et al. (1990), entretanto, observaram que a suplementação de meio de cultura com IBA (0,5mg/l) foi altamente efetiva na promoção da regeneração e enraizamento de explantes nodais. Ohyama (1970); Seki et al. (1971) e Minamizawa & Hirano (1973 a,b) só obtiveram formação de raiz em meio contendo auxina.

No presente trabalho, foram observadas formação de raízes em meio livre de hormônio, entretanto, estas eram finas e em pequeno número, inadequadas aos estudos citológicos. Resultados semelhantes foram obtidos por Hossain et al (1992) com *M.laevigata* com formação satisfatória de raízes em meio com IBA e raízes fracas, finas e em pequeno número em meio livre de auxina. Concluiu-se que ela foi necessária para o enraizamento das plantas. Trabalhando com esta mesma espécie, Islan et al.(1993) constataram que o meio de cultura suplementado com auxina melhorou a frequência de enraizamento, a qualidade das raízes e o número de raízes por estacas, e que o aumento das subculturas também contribuiu para o enraizamento, elevando a frequência de 43% na cultura inicial para 88% na quinta subcultura e o número de estacas enraizadas de 5,6 para 13,20, respectivamente.

No presente trabalho, o enraizamento dos ápices foliares da amoreira em alguns casos, ocorreu ainda em meio contendo IBA, sendo que, a maior parte somente começou a enraizar 15 a 20 dias após a transferência para meio livre de hormônio, e após este período os brotos não enraizaram mais. Estas observações concordam com Zaman et al.(1993), que observaram que brotos foliares de amoreira, *Malba* cultivar S1, iniciaram o enraizamento, na maior parte, em duas semanas de cultura, e os que não

produziram raízes neste intervalo, eram incapazes de produzi-las mesmo após cinco semanas.

Em trabalho com banana (*Musa* spp), Banerjee & Langhe (1985) controlaram o escurecimento do meio de cultura pela ação combinada de ácido ascórbico (10mg l^{-1}) e transferências quinzenais para meio fresco. Em técnica semelhante aplicada no presente trabalho, observou-se que o manuseio do explante no ácido ascórbico, durante a transferência, favoreceu a contaminação, mas a troca freqüente para meio fresco, a cada 15 dias, reduziu drasticamente a contaminação.

Eventuais brotações laterais foram observadas nos ápices de amoreira. Entretanto, não foi observado o alongamento dos ápices, talvez devido à ausência de citocininas, tais como BA ou BAP, no meio, largamente utilizadas nos trabalhos consultados. Foi observado que 80% dos ápices de *M.nigra* cultivados em meio adicionado com BAP, proliferaram em novos brotos e alongaram três centímetros em oito semanas de cultura (Yadav et al.,1990) e explantes excisados de sementes de *M.alba* germinados em meio asséptico, produziram brotos quando o meio foi suplementado com 2mg l^{-1} de BA.

4.4 Cromossomos mitóticos

Apesar dos diferentes pré-tratamentos empregados não foi possível estabelecer um protocolo padrão, e sim observar eventuais aparecimentos de metáfases, de qualidade regular, para a observação da morfologia dos cromossomos. A Figura 25 mostra metáfases em raízes pré-tratadas com colchicina 0,01% por 4h e 30min (a) e 8-hidroxiquinolina 0,03% por 3h (b).

Na Figura 25b pode-se observar os 28 cromossomos da espécie, onde comprova-se a existência de um par de cromossomos visivelmente maior que os 13 restantes e na Figura 25b pode-se observar a morfologia dos cromossomos. Osawa (1920) observou a presença de um par de cromossomos maiores ao trabalhar com plantas masculinas da espécie *M.bombycis*. Não foram observados cromossomos de tamanho intermediário como citado por Tahara (Sinotô, 1929).

A simples observação da existência de um par diferente de cromossomos do conjunto não permite deduzir como Tahara (Sinotô, 1929) sua ação como determinador da sexualidade, mesmo porque observações de campo com o clone IZ 56/4, conforme relatada no item 4.1.1. desta seção, parecem indicar que o tipo sexual da amoreira é determinado por ação hormonal influenciada pelo ambiente.

Os pré-tratamentos se mostraram eficientes para a contagem do número de cromossomos, mas não proporcionaram figuras com morfologia adequada à construção do cariótipo. Esta dificuldade pode

Figura 25 - (a) Metáfase em raiz do clone IZ56/4 (*M.alba* L.) pré-tratadas com colchicina à 0,01% durante 4h30 ($2n=28$) → par de cromossomos maiores. (b) Metáfase em raiz do clone IZ56/4 (*M.alba* L.) pré-tratadas com 8-hidroxiquinolina à 0,03% durante 2:45horas ($2n=28$).
Escala = 5µm

não ser indicativa da ineficiência dos inibidores de fuso ou inibidores de síntese protéica utilizados, mas possivelmente à problemas de permeabilidade das raízes da amoreira.

A contagem dos cromossomos em metáfase mitótica permitiram a contagem de 28 cromossomos conforme dados já relatados para várias espécies de *Morus* desde Sinotô (1929).

Basavaiah et al. (1989) relata também a presença de $2n = 28$ para a maioria dos cultivares de *Morus*, mas discute que a poliploidia, especialmente a aneuploidia, parece ter especial papel na sua evolução, como evidência a ocorrência de aneuplóides com $2n = 26, 27, 30$ cromossomos. Este fato aliado a presença de anel tetravalente na diacinese (Figura 19e) também observado por Sinotô (1929), e Rangaswami et al., (1976), e Gill & Gupta (1978), traz a possibilidade de que o número básico de cromossomos aqui observado seja $2n + 2 = 28$, ou seja, que o número básico de cromossomos no clone IZ56/4 seria $n = 13$.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos podem ser tiradas as seguintes conclusões:

- 1 - A microsporogênese no clone IZ15/7 (*M.alba* L.) é normal.
- 2 - Ocorrem flores hermafroditas no clone feminino Formosa (*M.alba* L.) e no clone predominantemente masculino IZ56/4 (*M.alba* L.).
- 3 - Nos clones Catânia Paulista, Nezumigaeshi e IZ 15/7 (*M.alba* L.), as flores mostraram-se sempre exclusivamente masculinas e nos clones Calabresa e IZ15/1 (*M.alba* L.) exclusivamente femininas, sendo, portanto, unissexuados.
- 4 - Foi definido um protocolo de estabelecimento *in vitro* de ápices foliares de amoreira, *M.alba* L.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. et al. **Molecular Biology of the Cell.** 3ª ed. New York: Garland Publishing, 1994. cap 20, p.1011-1035: Germ cell and fertilization.
- ALMEIDA, J.E.; SOARES, A.R.; RAMALHO, M.A.P.; FONSECA, T.C. Stabilité phénitypique chez le mûrier. **Sericologia**, La Mulatière v.31, n.3, p.469-74, 1991.
- BANERJEE, N.; LANGHE, E. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (Banana and plantain). **Plant Cell Reports**, v.4, n.6, p.351-354, Dec., 1985.
- BAPAT, V.A.; MHATRE, M.; RAO, P.S. Propagation of *Morus indica* L. (mulberry) by encapsulated shoot buds. **Plant Cell Reports**, v.6, n.5, p.393-395, Oct., 1987.

BAPAT, V.A.; RAO, P.S. *In vitro* growth of encapsulated axillary buds of mulberry (*Morus indica* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.20, n.1 , p.69-70, Jan., 1990.

BARLEY, L.H. **Manual of cultivated plants**. New York: MacMillan, 1954. 1116p.

BASAVAIAH; DANDIN, S.B.; MALA, V.R. Microsporogenese in hexaploid *Morus serrata* Roxb. **Cytologia**, v.54, n.4, p.747-751, Dec., 1989.

BASAVAIAH; DANDIN, S.B.; ANIL-DHAR; SENGUPTA, K. Meiosis in natural decosaploid (22x) *Morus nigra* L. **Cytologia**, v.55, n.3, p.505-509, Sep., 1990

BERGER, K; SCHAFFNER, W. *In vitro* propagation of the leguminous trees *Swartzia madagascariensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.40, n.3 , p.289-291, Mar., 1995.

BIONDI, S.; THORPE, T.A. Clonal propagation of forest tree species. In: Proceedings COSTED Symp. On Tissue Culture of Economically Important Plants, Rao (Ed.) Singapore, p.197-204, 1982

BURNHAM, C.R. **Discussions in Cytogenetics**. 2.ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1964. 375p.

CHRISTOPHER, T.; RAJAM, M.V. *In vitro* clonal propagation of *Capsicum* spp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.38, n.1, p.25-29, July, 1994.

CORCHETE, M.P; DIEZ, J.J.; VALLE, T. Micropropagation of *Ulmus pumila* L. from mature trees. **Plant Cell Reports**, v.12, n.9, p.534-536, July, 1993.

CUCO, S.M. **Citogenética da Seringueira [*Hevea Brasiliensis* (Willd. ex. Adr. de Juss.) Muell. Arg.]** Piracicaba. 1992. p.90. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade São Paulo.

DAS, B.C. Cytological studies in *Morus indica* L. and *Morus laevigata* Wall. **Caryologia**, v.14, n.1 , p.159-162, Jan./Apr., 1961.

DAS, B.C.; KRISHINASWAMI, S. Estimation of components of variation of leaf yeld and its related traits in mulberry. **Journal Sericulture Science Japan** vol38 , n.3., p.242-8, jun. 1969.

DATTA, M. Cytogenetical studies on two species of *Morus*. **Cytologia**, v.19, n.1, p.86-95, June, 1954.

DE ROBERTIS, E.D.P.; SAEZ, F.A.; DE ROBERTIS, E.M.F. **Biologia Celular**. Rio de Janeiro: Ateneo, 1977. 566 p.

DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation In: DEBERGH, P.C., ZIMMERMAN, R.H. (Ed.) **Micropropagation: technology and application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991. cap.1, p.1-13.

DELLAPORTA, S.L.; CALDERON-URREA, A. Sex determination in flowering plants **The Plant Cell**, v.5, p.1241-1251, Oct., 1993

DHAWAN, V.; BHOJWANI, S.S. *In vitro* vegetative propagation of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Plant Cell Reports**, v.4, n.6, p.315-318, Dec., 1985.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.36, n.2, p.211-7, Feb., 1994

- DOWBEN, R.M. **Cell biology**. New York: Harper & Row, 1971. cap.7, p.181-241: Chromosomes: DNA and its replication.
- ENOMOTO, S. Preservation of genetic resources of mulberry by means of tissue culture. **Japan. Agriculture Research Quaterly**, v.21, n.3, p.205-210, 1987.
- ERDEI, I.; KISS, Z.; MALIGA, P. Rapid clonal multiplication of *Digitalis lanata* in tissue culture. **Plant Cell Reports**, v.1, n.1, p.34-35, Aug., 1981.
- FONSECA, T.C.; ALMEIDA, J.E.; FONSECA, A.S. Effet de la selection de mûriers sur l'alimentation des vers a soie. **Sericologia**, La Mulatière, v.30, n.4, p.469-74, 1990.
- FONSECA, A.S.; FONSECA, T.C.; PAOLIERI, L. **Hibridos de *Morus alba* L.** Nova Odessa, 1982. 8p. (Nota científica, 3).
- FONSECA, A.S.; FONSECA, T.C.; PAOLIERI, L. Caracterização de algumas variedades de amoreira. **Zootecnia**, v.23, n.2, p.111-129, abr./jun., 1985a.

FONSECA, A.S.; FONSECA, T.C.; PAOLIERI, L. Melhoramento da amoreira por meio da hibridação artificial. **Boletim da Indústria Animal**, v.42, n.2, p.265-276, jul./dez., 1985b.

FONSECA, A.S.; FONSECA, T.C.; SCHAMMASS, E.A. Competição de híbridos artificiais de amoreira.II. **Boletim Indústria Animal**, v.44, n.2, p.315-322, jul./dez., 1987a.

FONSECA, A.S.; FONSECA, T.C.; SCHAMMASS, E.A.; CUNHA, E.A. Competição de híbridos naturais e artificiais de amoreira III. **Boletim Indústria Animal**, v.44, n.2, 323-328, jul./dez., 1987b.

FONSECA, T.C.; ALMEIDA, J.E.; OKAMOTO, F. Le programme d'amelioration du mûrier dans l'Etat de São Paulo au Brèsil. **Sericologia**, v.34, n.4, p.727-733, 1994.

GILL, B.S.; GUPTA, R.C. Cytological studies in the sex types of *Morus alba* L. (Moraceae) **Current Science**, v.48, n.1, p.35-6, Jan. 1979.

GOLDBERG, R.B.; BEALS, T.P.; SANDERS, P.M. Anther development: principles and pratical aplications. **The Plant Cell** v.5, p.1217-29, Oct., 1993.

HAZAMA, K. Breeding of mulberry tree. **Japan. Agriculture Research Quaterly**, v.3, n.2, p.15-19, 1968.

HIRAOKA, N.; YAMADA, N.; KODAMA, T.; TOMITA, Y. *In vitro* propagation of *Atractylodes lancea*. **Plant Cell Reports**, v.3, n.3, p.85-87, June, 1984.

HOSOKI, T.; ANDO, M.; KUBARA, T.; HAMADA, M.; ITAMI, M. *In vitro* propagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by a longitudinal shoot-split method. **Plant Cell Reports**, v.8, n.4, p.243-246, July, 1989.

HOSSAIN, M.; ROHMAN, S.M.; ZAMAN, A.; JOADER, O.I.; ISLAM, R. Micropropagation of *Morus laevigata* Wall. from mature trees. **Plant Cell Reports**, v.11, n.10, p.522-524, Sep., 1992.

HOVANESIAN, J.C.; TORRES, K.C. Micropropagation of *Uniola paniculata* L. **Plant Cell Reports**, v.5, n.5, p.385-386, Oct. 1986

HUGHES, K.W. Ornamental species In: CONGER, B.V. (Ed.) **Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques**. Flórida: : CRC Press, 1981. cap2, p.5-50.

- IDEDA, K.; TESHIMA, D.; AOYAMA, T.; SATAKE, M.; SHIMOMURA, K. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha*. **Plant Cell Reports**, v.7, n.4 , p.288-291, June, 1988.
- ISLAM, R.; ZAMAN, A.; JOADER, O.I.; BARMAN, A.C. *In vitro* propagation as an aid for cloning of *Morus laevigata* Wall. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.33, n.3 , p.339-341, June, 1993.
- JAIN, A.K.; DANDIN, S.B.; SENGUPTA, K. *In vitro* propagation through axillary bud multiplication in different mulberry genotypes. **Plant Cell Reports**, v.8, n. 12 , p.737-740, May, 1990.
- JHA, S.; JHA, T.B. Micropropagation of *Cephaelis ipecacuanha* Rich. **Plant Cell Reports**, v.8 , n 8 , p.437-439, Dec.,1989.
- JHA, T.; SEN, S.K. Micropropagation of elite Darjeeling tea clone. **Plant Cell Reports**, v.11, n.3, p.101-104, Apr., 1992.
- KATHIRAVAN, K.; SHAJAHAN, A.; GANAPATHI, A. Regeneration of plantlets from hypocotyl derived callus of *Morus alba*. **Israel Journal of Plant Sciences**, v.43, n.3, p.259-262, 1995.

KATSUMATA, F. Shape of idioblasts in mulberry leaves with special reference to the classification of mulberry trees. **Journal Sericultural Science Japan**, v.40, n.4, p.313-322, Aug., 1971.

KATSUMATA, F. Mulberry species in West-Java and their peculiarities. **Journal Sericultural Science Japan**, v.41, n.3, p.213-222, June, 1972.

KATSUMATA, F.; ISHIGURO, Y. Chromosomes and morphological characteristics of *Morus cathayama* Hemsley from Java. **Journal Sericultural Science Japan**, v.49, n.6, p.471-476, Dec., 1980.

KIM, H.; PATEL, K.R.; THORPE, T.A. Regeneration of mulberry plantlets through tissue culture. **Botanical Gazette**, v.146, n.3, p.335-340, Sep., 1985.

KRISHNAN, P.N.; SEENI, S. Rapid micropropagation of *Woodfordia fruticosa* (L.) Kurz (Lythraceae), a rare medicinal plant. **Plant Cell Reports**, v.14, n. 1, p.55-58, Nov., 1994.

KRISHNAN, P.N.; SUDHA, C.G.; SEENI, S. Rapid propagation through shoot tip culture of *Trichopus zeylanicus* Gaertn., a rare ethnomedicinal plant. **Plant Cell Reports**, v.14, n.11, p.708-711, Aug., 1995.

LEVAN, A. Syncyte formation in the pollen mother cells of haploid *Phleum pratense*. **Hereditas** v.27, p.243-253, 1941

McCOWN, D.D.; McCOWN, B.H. North American hardwoods. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. (eds) **Cell and Tissue Culture in forestry**, vol3, M. Nijhoff Publ., Dordrecht p.247-260, 1987.

MHATRE, M.; BAPAT, V.A.; RAO, P.S. Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L.). **Plant Cell Reports**, v.4, n.2, p.78-80, Apr., 1985.

MINIMIZAWA, K.; HIRANO, H. Effects of the concentrations of several sugars on differentiation in excised stem segments of mulberry trees cultivated *in vitro*. **Journal Sericultural Science Japan**, v.43, n.1, p.51-57, Jan., 1973a.

MINIMIZAWA, K.; HIRANO, H. Differences of differentiation among the kinds of explants of mulberry plant *in vitro*. **Journal Sericultural Science Japan**, v.43, n.1, p.94-97, Jan., 1973b.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review Plant Physiology**, n.25, p.135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

NAKAMURA, Y. *In vitro* propagation techniques of tea plants. **Japan Agricultural Research Quaterly**, v.25, n.3, p.185-194, Dec., 1991.

OHYAMA, K. Tissue culture in mulberry tree. **Japan Agricultural Research Quaterly**, v.5, n.1, p.30-34, Jan. , 1970.

OHYAMA, K.; OKA, S. Regeneration of whole plants from isolated shoot tips of mulberry tree. **Journal Sericultural Science Japan**, v.45, n.2, p.115-120, Apr., 1976.

OKA, S.; OHYAMA, K. Induction of callus and effects of constituents of media on callus formation in mulberry tree. **Journal Sericultural Science Japan**, v.42, n.4, p.317-324, Aug., 1973.

OKA, S.; OHYAMA, K. Studies on *in vitro* culture excised buds in mulberry tree. I. Effects of growth substances on the development of shoots and organ formation from winter buds. **Journal Sericultural Science Japan**, v.43, n.3, p.230-235, June, 1974.

OKA, S.; OHYAMA, K. Studies on *in vitro* culture excised buds in mulberry tree. II. Effects of growth substances on the development of shoots from axillary bud. **Journal Sericultural Science Japan**, v.44, n.6, p.444-450, Dec., 1975.

OKA, S.; OHYAMA, K. *In vitro* initiation of adventitious buds and its modifications by high concentration of benzyladenine in leaf tissue of mulberry (*Morus alba*). **Canadian Journal of Botany**, v.59, n.1 p.68-74, Jan., 1981.

OKA, S.; OHYAMA, K. Mulberry (*Morus alba* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biothecnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer Verlag, 1986. cap.10, p384-392.

OSAWA, I. Cytological and experimental studies in *Morus* with special reference to triploid mutants. **Bulletin Imperial Sericultural Experimental Station**, v.1, p.318-369, 1920.

OVERSEAS TECHNICAL COOPERATION AGENCY (O.T.C.A.) **Sericulture**, Tokyo, 1971. 127p. (Technical Book Series 18)

PADHYA, M.A.; METHA, A.R. Propagation of fern (*Nephrolepis*) through tissue culture. **Plant Cell Reports**, v.1, n.6. p.261-263, Dec., 1982

PANDEY, R.; CHANDEL, K.P.S.; RAO, S.R. *In vitro* propagation of *Allium tuberosum* Rotl. ex. Spring by shoot proliferation. **Plant Cell Reports**, v.11, n.7, p.375-378, July, 1992.

PATEL, G.K.; BAPAT, V.A.; RAO, P.S. *In vitro* culture of organ explants of *Morus indica*: Plant regeneration and fruit formation in axillary bud culture. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiol. Bd.** v.111, p.465-468, 1983.

PEREZ, C.; RODRIGUES, R.; TAMES, R.S. *In vitro* filbert (*Corylus avellana* L.) micropropagation from shoot and cotyledonary node segments. **Plant Cell Reports**, v.4, n.3, p.137-139, June, 1985.

RANGASWAMI, G.; NARASIMHANNA, M.N.; KASIVISWANATHAN, K.; SASTRY, C.R.; JOLLY, M.S. **Manual on sericulture.** Rome:FAO, 1976. v.1: Mulberry Cultivation, 107p. (Agricultural Services Buletin n.15)

RAUBER, M.; GRUNEWALDT, J. *In vitro* regeneration in *Allium* species. **Plant Cell Reports**, v.7, n.6, p.426-429, Oct., 1988.

REED, B.M. Micropropagation of meadowfoan (*Limnanthes* spp). **Plant Cell Reports** v.10, n.2, p.94-6, June, 1991.

- ROYAN-SUBRAMANIAM, S. The chromosomes of *Morus indica*, Linn. **Current. Sci.** v.34, n.18 , p.539-40, Sep. , 1965.
- ROUT, G.R.; DAS, P. Micropropagation of *Madhuca longifolia* (Koenig) MacBride var. *latifolia* Roxb. **Plant Cell. Reports** v.12, n.9 p.513-6, July, 1993.
- SAITO, H. *In vitro* propagation of mulberry through adventitious bud induction system. **Journal Sericultural Science Japan.** v.61, n.1, p.46-51, Feb., 1992.
- SCARPELLI, E. Viagem à Itália e ao Japão (Relatório) Serviço de Sericicultura, Secretária da Agricultura, São Paulo. 1968, 53p.
- SEKI, H.; TAKEDA, M.; TSUTSUMI, K.; USHIKI, T. Studies on the callus culture of the mulberry tree. (I) The effect of concentration of auxin and kinetin on the mulberry stem. **Journal Sericultural Science Japan** v.40, n. 2 , 81-5, Apr., 1971.
- SHIMOYA , C. **Curso de botânica** (organografia e anatomia) Universidade Rural do Estado de Minas Gerais : Escola Superior de Agricultura. Viçosa, MG. 1966. 237p.

SHIPTON, W.A. Clonal propagation of *Callistemon* by tissue culture techniques. **Plant Cell Reports** v.1, n. 5 , p.199-201, Oct.,1982.

SHIPTON, W.A.; JACKES, B.R. Clonal propagation of *Leptospermum* spp by tissue culture. **Plant Cell Reports** v.5, n. 1 , p.5-8, Feb., 1986.

SINOTÔ, Y. Chromosomes studies in some dioecious plants with special reference to allosomes. **Cytologia**, v.1, n.1, p.109-191, Aug., 1929.

SITA, G.L.; RANI, B.S. In vitro propagation of *Eucalyptus grandis* L., by tissue culture. **Plant Cell. Reports**, v.4, n.2, p. 63-65, Apr., 1985.

SKIRVIN, R.M. Fruit Crops In: CONGER, B.V. (Ed.) **Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques**. Boca Raton : CRC Press, 1981. cap.3, p.51-140.

SUSHEELAMMA, B.N.; KUMAR, J.S.; DANDIN, S.B.; JOLLY, M.S.; SENGUPTA, K.; RAJU, R. Kariomorphological studies in a few exotics varieties of genus *Morus* L. **Cytologia**, v.55, n.1, p.107-114, Mar., 1990.

SWARTZ,H.J. Post culture behavior: genetic and epigenetic effects and related problems. In: DEBERGH, P.C., ZIMMERMAN, R.H., eds. **Micropropagation: technology and application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991. cap.6, p.95-121.

SWANSON, C.P.; MERZ, T.; YOUNG, W.J. **Cytogenetics - chromosome, in division, inheritance and evolution.** London : Prentice Hall, 1981. 577p.

TAMURA, Y.; NAKAMURA, S.; FUKUI, H.; TABATA, M. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tip culture. **Plant Cell Reports**, v.3, n.5, p.180-182, Oct., 1984.

THORPE, T.A. Biotechnological applications of tissue culture to forest tree improvement. **Biotechnology Advances**, v.1, p.263-278, 1983.

TING-ZING, Z.; YUN-FANG, T.; GUANG-XIAN, H.; HAU AIZHONG, F.; BEN, M. **Mulberry cultivation** Rome:FAO 1988. 127p. (Agricultural Services Bulletin 73/1)

VERMA, R.C.; SARKAR, A.; DAS, B.C. Cytoplasmatic channels and chromatin migration in mulberry. **Cytologia** v.51, n.7, p.731-6, jun. 1986.

WAWROSCH, C.; KOPP, B.; KUBELKA, W. *In vitro* propagation of *Achillea asplenifolia* VENT through multiple shoot regeneration. **Plant Cell Reports**, v.14, n. 2/3, p.161-164, Dec., 1994.

YADAV, U.; LAL, M.; JAISWAL, V.S. Micropropagation of *Morus nigra* from shoot tip and nodal explants of mature trees. **Scientia Horticultural**, v.44, n. 1- 2 , p.61-67, Sep., 1990.

ZAMAN, A.; ISLAM,R.; HOSSAIN,M.; BARI,M.A.; JOADER,O.I. Plant regeneration and seedless fruit formation in nodal explant cultures of *Morus alba* L cv S1. **Sericologia**, v.33, n.2, p.313-318, 1993.

ZIMMERMAN, R.H. Micropropagation of temperate zone fruit and nut crops. In: DEBERGH, P.C., ZIMMERMAN, R.H. (Eds.) **Micropropagation: technology and application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991. cap.1, p..231-246.

7. APÊNDICE

CÉLULA CISTOLÍTICA - CISTÓLITO = concreção de carbonato de cálcio sobre saliências da parede celular de algumas células da epiderme de certas plantas (Ferri et al.; 1978).

CLONES = uma vez que a amoreira é dióica e de reprodução vegetativa, todos os acessos do banco de germoplasma de amoreira do Instituto de Zootecnia e os obtidos no programa de melhoramento, para o trabalho de tese, foram definidos como clones.

IDIOBLASTOS = célula em um tecido qualquer, que difere das demais, pela forma, tamanho, conteúdo, espessura da parede, ou mesmo pela função; pode estar isolada ou em grupos; as células pétreas do mesocarpo das pêras, por exemplo, são idioblastos (Ferri et al.; 1978).

HIPERIDRICIDADE ou VITRIFICAÇÃO = problema que ocorre na fase de desenvolvimento dos explantes durante a cultura. *in vitro*.

Quando ela ocorre os tecidos sofrem uma mudança em seus processos metabólicos o que leva a uma alteração na sua estrutura e aparência

normal. Tecidos hiperídricos exibem redução na lignificação fazendo com que os vasos e os traqueídeos estejam ausentes ou possuam uma forma anormal nos caules, gemas e folhas (Pasqual et al., 1997).

TERMINOLOGIA USADA PARA DETERMINAÇÃO DO SEXO

Segundo Westergaard (1958):

Uma espécie é **unissexual** ou **dióica** quando as flores masculinas e femininas, ocorrem em indivíduos diferentes.

Uma espécie é **bissexual** se as flores masculinas e femininas ocorrem sobre a mesma planta. Plantas bissexuais podem ser **hermafroditas** quando os dois sexos são encontrados na mesma flor, ou **monóicas** quando limitadas a flores separadas na mesma planta.

Segundo Westergaard (1958), Burnhan (1962) e Frankel & Galun (1977):

1. Expressão sexual em flores individuais:

1.1. **Flor Monoclina** (flor com os dois sexos)

Hermafrodita = flores completas (estames e pistilos) na mesma flor

1.2 **Flor Diclina** (flor com sexos separados)

Estaminada ou Andróica - flor tendo somente estames

Pistilada ou Ginóica ou Carpelada - flor tendo somente carpelo(s)

2. Expressão sexual em plantas individuais:

Hermafrodita - planta com somente flores hermafroditas

Monóica - planta com flores estaminadas e pistiladas

Andróica ou Masculina - planta com somente flores estaminadas

Ginóica ou Feminina - planta com somente flores pistiladas

Andromonóica - plantas com flores estaminadas e hermafroditas

Ginomonóica - plantas com flores pistiladas e hermafroditas

Trimonóicas - plantas com os três tipos de flores (estaminadas, pistiladas e hermafroditas)

3. Expressão sexual de grupos de plantas:

Hermafrodita - grupo consistindo de somente plantas hermafroditas

Monóica - grupo consistindo de somente plantas monóicas

Dióica - grupo consistindo de plantas andróicas e ginóicas

Androdióica - grupo consistindo de plantas andróicas e hermafroditas

Ginodióica - grupo consistindo de plantas ginóicas e hermafroditas

Neste trabalho nos referimos, à exemplo da classificação acima, em plantas geradas de cruzamento entre variedades masculinas e femininas e que expressam:

somente um tipo sexual de flor = Clones Unissexuados = como IZ15/7 (masculino) e IZ15/1 (feminino)

com predominância de flores masculinas (>75%) e pequena produção de flores femininas e hermafroditas = como o clone IZ56/4

ABREVIATURAS

BA	benziladenina
BAP	6-benzilaminopurina
C.M.G.P.	célula mãe do grão-de-pólen
C.M.S.E.	célula mãe do saco embrionário
CEPAS	Centro Estadual de Pesquisa Aplicada em Sericicultura
ESALQ	Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiróz”
IAA	Acido indol-acético
KIN	kinetin = quinetina
MS	meio Murashige & Skoog
NAA	ácido naftaleno-acético
O.T.C.A.	Overseas Technical Cooperation Agency
S.E.	saco embrionário
USP	Universidade de São Paulo

ETABLISSEMENT DE MERISTEMES APICAUX DU MURIER, *MORUS ALBA* L., *IN VITRO**

FONSECA T.C.^{2**}, VIEIRA M.L.C.³ & BANDEL G³

2. Divisao de Zootecnia Diversificada, D3, Rua Heitor Penteado 56, CP 60, CEP 13.460-000, Nova Odessa, Sao Paulo, Brasil.

3. Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura «Luiz de Queiroz», Av. Padua Dias 11, CP 83, CEP 13- 400-970 Piracicaba, Sao Paulo, Brasil.

*Un protocole d'établissement des méristèmes apicaux du mûrier a été élaboré avec le but de fournir des racines convenables pour des études cytologiques. Les prétraitements effectués sur les racines avec 8-hydroxyquinoléine, colchicine et/ou cycloheximide ont permis d'observer le nombre de chromosomes, $2n = 28$, chez le clone IZ 56/4 de *M. alba*.*

Mots-clé : *M. alba*, culture *in vitro*, chromosomes.

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus alba* L.) est une plante de développement rapide à pollinisation croisée. La propagation par graine ne préserve pas le vrai type à cause de sa grande hétérozygosity (Das, 1983). Le nombre diploïde de chromosomes du genre *Morus* est 28, mais des cellules de haute polyploidie se rencontrent. Parmi les polyploidies, les triploidies présentent des caractéristiques désirables comme, un meilleur développement des branches et des feuilles, une qualité nutritionnelle supérieure et une résistance au froid et aux maladies (Kim et coll., 1985). Cependant, d'après Das (1983) la production et la multiplication des triploïdes sont retardées. Ordinairement, le mûrier est multiplié par bouturage mais quelques génotypes à haute valeur nutritive ont des difficultés à produire des racines (Jain et coll., 1990).

La propagation clonale après culture de tissu offre une alternative à la propagation végétative des espèces ligneuses présentant des caractéristiques désirées (Biondi et Thorpe, 1982; Thorpe, 1983). La régénération *in vitro* du mûrier suivie de la réimplantation en champ a été rapportée chez *M. alba*, *M. bombycis*, *M. nigra* et *M. indica* par Oka et Ohyama (1986) au Japon, Bapat et Rao (1990), Yadav et coll. (1990) et Kathiravan et coll. (1995) en Inde et Hossain et coll. (1992) au Bangladesh.

L'utilisation des sommets de pousses et des bourgeons noeudaux du mûrier comme explants c'est un moyen utile pour la propagation de plantes saines et pour la préservation des ressources génétiques. Des plantules de *M. alba* cv MR₂ ont aussi été obtenues à partir d'hypocotyles prélevés sur des cultures axéniques de graines cultivés sur milieu MS (Murashige et Skoog, 1962), enrichi de BA (0,5 mg/l) et d'AIA (0,5 mg/l) (Kathiravan et coll, 1995).

Jain et coll. (1990), en travaillant avec quatre espèces de mûrier, *M. indica*, *M. alba*, *M. rotundifolia* et *M. bombycis* ont observé que la réponse à la production de pousses a varié en fonction du génotype. Cependant, Saito (1992) n'a pas observé le même phénomène en travaillant avec des variétés de *M. alba*.

* Travail partiel de doctorat effectué à l'ESALQ, Piracicaba, Brésil.

** Avec bourse du CNPq

Aucun des travaux publiés sur la micropropagation ne comporte d'étude sur la stabilité chromosomique chez des plantes dérivées de ce processus.

Quelques auteurs ont relaté la présence de trois paires de chromosomes distincts et géants dans l'ensemble chromosomique de *M. bombycis* (Sinoto, 1929), *M. indica* (Royan Subramanian, 1965) et *M. alba* (Gill et Gupta, 1979). Sinoto (1929) a aussi relaté la divergence entre Tahara et Osawa par rapport à ces chromosomes.

Ce travail a été fait dans le but d'étudier l'établissement des sommets des pousses dans le milieu de culture et aussi l'obtention des racines pour observer les chromosomes mitotiques.

MATERIELS ET METHODES

Le matériel végétal utilisé pour la mise au point du protocole de l'introduction *in vitro* des méristèmes apicaux du mûrier a été le clone IZ56/4 (Fig. 1) provenant du programme d'amélioration du mûrier (Fonseca et coll., 1994).

Le développement des plantes productrices des explants a été réalisé dans une serre en suivant la suggestion d'Oka et Ohyama (1986) qui ont considéré cette pratique utile pour l'obtention d'explants propres, car les tissus des branches cultivées en champ sont quelquefois infestés de micro-organismes, qui rendent la stérilisation impossible. Cependant, cette technique n'a pas empêché ce type de contamination résultant peut-être des multiples reproductions végétatives chez le mûrier. C'est seulement par l'addition des antibiotiques au milieu de culture, que l'on peut contrôler ces contaminations.

Les explants (les méristèmes apicaux) ont été prélevés sur des boutures cultivées dans des boîtes de sable en serre et recueillis dans un bécher rempli d'eau distillée. Afin de mettre en place une culture axénique les explants ont été trempés dans une solution à 1% de détergent, puis rincés à l'eau courante, pendant 10 minutes. La désinfection a été faite à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 2% (v/v) (Tableau I) pendant 12 minutes après un passage dans l'alcool à 70% (v/v) pendant 40 secondes. Ils sont ensuite rincés soigneusement 5 à 6 fois dans de l'eau distillée stérile.

Les méristèmes apicaux ont été débarrassés des feuilles superflues et coupés aux extrémités pour obtenir des explants de 2,5 cm et comportant 3 bourgeons.

Les explants ont été mis à enraciner sur le milieu de culture de Murashige et Skoog (1962) contenant la moitié de la concentration originale en micro-et-macro-éléments et vitamines (MS/2) additionné de 15 g/l de saccharose. Le milieu a été ajusté à un pH de 5,8 avec 0,1N NaOH / 0,1N HCl avant l'addition d'agar (0,8% p/v) et a été stérilisé à l'autoclave à 120° C pendant 20 minutes. Après l'autoclavage de la tétracycline (100µg/ml) stérilisée par filtration a été ajoutée.

Après une semaine les explants ont été repiqués sur le milieu MS/2 additionné d'acide indol-butyrique (AIB) (0,4ml/l) pendant deux semaines pour l'induction des racines, puis repiqués dans le MS/2, tous les jours.

Etude des chromosomes mitotiques:

Les racines induites *in vitro* ont été recueillies et traitées au préalable avec des inhibiteurs du fuseau mitotique (8-hydroxyquinoléine à 0,03%, colchicine à 0,01% et 0,05%) ou avec un inhibiteur de la synthèse protéique (cycloheximide à 140ppm) en temps variés, afin d'obtenir la meilleure morphologie chromosomique. Les racines ont ensuite été fixées dans la solution de Carnoy (éthanol:acide acétique 3:1) pendant 24 heures et conservées en permanence dans l'alcool 70% (v/v) à 10° C.

Pour la coloration des racines nous avons utilisé la méthode de Feulgen avec hydrolyse de 5 minutes dans HCl 1N à 60° C, suivie d'un traitement par réactif de Schiff (fuchsine leucobasique) pendant 45 minutes. Les racines ont été rincées à l'eau distillée pendant 5 minutes puis écrasées en carmin acétique à 2%. Les lames considérées comme satisfaisantes ont été séparées des lamelles dans l'acide acétique 45% et séchées à l'air avant d'être montées dans le baume du Canada.

Les figures mitotiques ont été photographiées avec un microscope Olympus avec optovar 1,25X sur un film Copexpan (Agfa) et filtre Olympus vert.

RESULTATS ET DISCUSSION

En fonction de ces études, on peut donc arriver à un protocole adapté aux méristèmes apicaux du mûrier *in vitro* (Tableau 2) donnant une très bonne production de racines (Fig. 2).

Lors des 22 essais réalisés en 1994, nous avons subi une perte du matériel provoquée par l'oxydation du milieu de culture et sa contamination. Il en a résulté une baisse du nombre de racines, même chez les survivants. Nous avons testé plusieurs alternatives pour maîtriser l'oxydation du milieu qui paraît être le principal problème de survie et de production de racines par explant.

Fig 1. Le clone IZ56/4 dans la collection de germoplasme au Centro Estadual de Pesquisa Aplicada a Sericulturra (CEPAS), Galia, Brésil.

Fig 1. The clone IZ56/4 in the germplasm collection at the Centro Estadual de Pesquisa Aplicada a Sericulturra (CEPAS), Galia, Brazil.

Tableau 1. Solution désinfectante.

Table 1. Disinfectant solution.

Composant / Component	Quantité/100 ml / Quantity/100ml
NaOCl	16,6ml
Movadol	0,1ml
Tween® 80	1 goutte / 1 drop
H ₂ O distillée / H ₂ O distilled	jusqu'à 100ml / up to 100ml

Pour maîtriser cette oxydation, pendant les repiquages, les explants ont été manipulés dans une solution d'acide ascorbique à 0,1 mg/l. Cependant, aucune réponse positive n'en a résulté à cause de la contamination dans les sous-cultures. Pour régler ce problème, nous avons réalisé deux pulvérisations sur les boutures avec du Dithane (2g/l) une semaine avant et la veille de la récolte des explants. Ce traitement n'a pas permis d'amélioration car il s'est révélé toxique pour les explants.

Tableau 2. Protocole d'établissement de méristèmes apicaux du mûrier in vitro.

Table 2. Protocol for establishing in vitro apical meristems of mulberry.

01. Récolte des explants.	01. Collection of explants
02. Récolte des sommets des pousses dans l'eau	02. Collection of apex of shoots in water.
03. Désinfection Lavage des explants dans une solution de détergent à 1%. Lavage dans l'eau courante pendant 10 minutes.	03. Desinfection. <i>Washing of explants in a detergent solution at 1%. Washing with clear water during 10 minutes.</i>
04. Désinfection sous flux laminaire. Immersion des explants dans l'alcool à 70% (v/v) pendant 40 secondes Immersion des explants dans la solution hypochlorite (2%) + Movadol (0,1%) + Tween (0,02%) pendant 12 à 15 minutes Lavage dans l'eau distillée stérile 5 à 6 fois.	04. Desinfection under a laminar flow <i>Immersion of explants in 70% alcohol (v/v) during 40 seconds.</i> <i>Immersion of explants in an hypochlorite solution (2%) + Movadol (0,1%) + Tween (0,02%) during 12 to 15 minutes.</i> <i>Washing in sterile distilled water 5 to 6 times.</i>
05. Culture Culture des explants sur milieu MS/2 plus Tétracycline (0,01%) pendant 7 jour. Repiquage en MS/2 + Tétracycline (0,01%) plus AIB (0,004%) pendant 15 jours. Repiquage en MS/2 + Tétracycline (0,01%) tous les 15 jours	05. Cultivation <i>Cultivation of explants on MS/2 medium plus Tetracycline (0,01%) during 7 days</i> <i>Planting out in MS/2 + Tetracycline (0,01%) + AIB (0,004%) during 15 days.</i> <i>Planting out in MS/2 + Tetracycline (0,01%) + every 2 weeks.</i>

En 1995 douze nouvelles tentatives ont été réalisées. Pour huit d'entre elles, la culture a été faite sur milieu MS/2 et pour les quatre autres, sur milieu MS/2 additionné de tétracycline à 0,01 %. Sur les 8 essais sur MS/2, les 3 premiers ont présenté une perte moyenne de 10 % due à la contamination, avec cependant une production inconstante de racines. Dans trois autres essais il n'y a pas eu formation de racines car les explants se sont nécrosés dans les premières semaines, peut-être à cause du nettoyage des boutures à l'hypochlorite de sodium à 1% avant les récoltes. Dans les 2 derniers essais, les explants ont été mis au réfrigérateur (8 °C), pour contrôler la production de composés phénoliques après les récoltes, mais ils n'ont pas résisté.

Au vu de ces problèmes nous avons décidé de travailler avec le milieu MS/2 enrichi avec de la tétracycline; dans deux des essais le milieu a été changé chaque semaine et dans les autres tous les 15 jours. Le pourcentage de contamination a été en moyenne de 26 % sur les trois premiers essais et de 5 % dans le dernier. Ces résultats ne diffèrent pas de ceux enregistrés dans la littérature par Rauber and Grunewaldt (1988), Reed (1991), Hovanesian and Torres (1986) et Dhawan and Bhojwani (1985). La production de racines a été importante dans 2 essais avec un aspect vigoureux convenable pour les études cytologiques.

Fig 2: Méristèmes apicaux du clone IZ56/4 racinés in vitro selon le protocole du Tableau 2

Fig 2. Apical meristems of clone IZ56/4 rooted in vitro according to the protocol in Table 2.

Dans ce travail, le but principal d'établissement de méristèmes apicaux en milieu de culture était la production des racines pour l'étude cytogénétique. Nous avons rencontré dans la littérature des travaux sur l'enracinement spontané et facilité chez le mûrier contrairement à ce que l'on observe normalement chez les ligneuses, avec l'utilisation de faibles concentrations d'acide indol-butyrique (AIB), en observant que les valeurs élevées ont provoqué un cal à la base des rameaux (Kim et coll., 1985) ce que nous avons éventuellement constaté (Fig. 3).

Néanmoins, on trouve des résultats différents sur les effets de l'auxine sur l'enracinement du mûrier dans la littérature. Enomoto (1987) dans un travail sur la préservation des ressources génétiques du mûrier au moyen de la culture de tissu, où quelques cultivars du mûrier ont été développés sur milieu avec 0,1 mg/l de beenzyladine (BA), a obtenu l'enracinement des bourgeons 10 jours après le changement pour un milieu sans hormone. Jain et coll. (1990), cependant, ont observé que l'adjonction d'AIB (0,5 mg/l) au milieu de culture a été très efficace dans la promotion de la régénération et de l'enracinement des explants nodaux. Ohyama (1970), Seki et coll. (1971) ont seulement obtenu la formation de racines dans le milieu avec de l'auxine.

Dans ce travail nous avons observé des formations spontanées de racines sur milieu sans hormone; cependant, ces racines étaient fines et très peu convenables pour des études cytologiques. Des résultats semblables ont été obtenus par Hossain et coll. (1992) avec *M. laevigata*, avec formation satisfaisante de racines dans le milieu additionné d'AIB et présence de racines faibles, fines et peu nombreuses sur milieu sans auxine. Ils en ont donc déduit la nécessité d'auxine pour l'enracinement efficace chez cette espèce. En travaillant également avec *M. laevigata*, Islan et coll., (1993) ont constaté que le milieu supplémenté par les auxines améliore la fréquence d'enracinement et le nombre de racines par bouture; de même, l'augmentation des repiquages a contribué à l'enracinement en élevant la fréquence

Fig 3. Formation de cal dans la culture in vitro du clone IZ56/4..

Fig 3: Cal formation during in vitro growth of clone IZ56/4.

Fig 4. Photomicrographie de la métaphase mitotique du clone IZS56/4 prétraité avec la colchicine à 0,01 % (4:30 h), que permet l'observation des 28 chromosomes (13 paires de petis et 1 paire de grand (indiquée par les deux flèches)).

Fig 4. Photomicrography of the mitotic metaphase of clone IZ56/4 pretreated with 0,01 % colchicine (4:30) which enables the observation of the 28 chromosomes (13 pairs of small ones and 1 pair of big one (indicated by the two arrows)).

de 43 % pour la culture initiale à 88 % pour le cinquième repiquage, les nombres de boutures entraînés passant de 5,6 à 13,20 % respectivement.

Perez et coll. (1985) ont observé que des bourgeons de *Corylus avellana*, un arbre fruitier de grande importance économique et bien distribué en Espagne, n'ont pas fourni de racines en présence d'AIB, alors que le contraire a été observé sur le mûrier dans le présent travail, où l'enracinement a été observé même sur milieu avec auxine.

Dans notre travail, la plupart des pousses ont commencé à s'enraciner après le remplacement du milieu contenant de l'AIB par le milieu sans auxine, c'est à dire 15 à 20 jours après l'inoculation.

Malgré les différents prétraitements effectués sur les racines, elles n'ont pas permis de résultat démonstratif mais d'éventuelles apparitions de métaphases régulières pour observer la morphologie des chromosomes. Cette difficulté peut ne pas résulter d'un manque d'efficacité des inhibiteurs du fuseau ou de la synthèse protéique, mais peut-être des problèmes de perméabilité des racines, ce qui aurait nécessité des études plus approfondies.

Dans les études réalisées sur quelques cellules de racines on a pu vérifier le nombre de chromosomes $2n = 28$ (Fig. 4), ce que confirme le nombre de base $n = 14$ des premiers rapports faits par Tahara en 1909 (Sinoto, 1929) et confirmés par des travaux sur le mûrier comme, par exemple, sur *M. alba* par Gill et Gupta (1979), *M. indica* par Royan-Subramanian (1965), *M. nigra* par Basavaiah et coll. (1990) et quelques autres espèces par Susheelamma et coll.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient beaucoup Pr. Bernard Lejeune, de l'Université de Paris-Sud, France, pour ses remarques avisées et sa contribution à la rédaction de ce manuscrit.

REFERENCES

- BANERJEE N., LANGHE E. (1985) A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). *Plant Cell Reports*, 4, 351-354.
- BAPAT V.A., RAO P.S. (1990) *In vitro* growth of encapsulated axillary buds of mulberry (*Morus indica* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20, 69-70.
- BASAVAIAH, DANDIA S.B., ANIL DHAR, SENGUPTA K. (1990) Meiosis in natural decaploid (22x) *Morus nigra* L., *Cytologia* 55, 505-509.
- BIONDI S., THORPE T.A. (1982) Clonal propagation of forest tree species. In: Bayaj Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol.1, tree 1, Springer-Verlag, Berlin, 197-204p.
- DAS B.C. (1983) Mulberry taxonomy, cytogenetics and breeding. National Seminar on Silk Research and Development. March 10-13, Bangalore, India.
- DHAWAN V., BHOJWANI S.S. (1985) *In vitro* vegetative propagation of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Plant Cell Reports* 4, 315-318.
- ENOMOTO S. (1987) Preservation of genetic resources of mulberry by means of tissue culture. *Jpn. Agric. Res. Q.* 21(3), 205-210.
- FONSECA A.S., FONSECA T.C., PAOLIERI L. (1985) Melhoramento da amoreira por meio da hibridação artificial. *B. Industr. Anim.* 42(2), 265-276.
- FONSECA T.C., ALMEIDA J.E., OKAMOTO F. (1994) Le programme d'amélioration du mûrier dans l'Etat de Sao Paulo au Brésil. *Sericologia* 34(4), 727-733.
- GILL B.S., GUPTA R.C. (1979) Cytological studies in the sex types of *Morus alba* L (Moraceae) *Current Sci.* 48(1), 35-36.
- HOSSAIN M., RAHMAN S.M., ZAMAN A., JOADER O.I., ISLAN R. (1992) Micropropagation in *M. laevigata* Wall. from mature trees. *Plant Cell Reports* 11:522-524.
- HOVANESIAN J.C., TORRES K.C. (1986) Micropropagation of *Uniola paniculata* L. *Plant Cell Reports* 5, 385-386.
- HUGUES K.W. (1981) Fruit crops In: Conger B.V. (ed.) *Cloning agricultural plants via in vitro techniques* (pp 5-50) CRC Press, Boca Raton.

- ISLAN R., ZAMAN A., JOADER O.I., BARMAN A.C. (1993) *In vitro* propagation as an aid for cloning of *Morus laevigata* Wall. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33, 339-341.
- JAIN A.K., DANDIN S.B., SENGUPTA K. (1990) *In vitro* propagation through axillary bud multiplication in different mulberry genotypes. Plant Cell Reports 8, 737-740.
- KATHIRAVAN K., SHAJAHAN A. GANAPATHIA. (1995) Regeneration of plantlets from hypocotyl derived callus of *Morus alba*. Israel J. of Plant Sci. 43(3), 259-262.
- KIM H., PATEL K.R., THORPE T.A (1985) Regeneration of mulberry plantlets through tissue culture. Bot. Gaz. 146(3), 335-340.
- MHATRE M.; BAPAT V.A., RAO P.S. (1985) Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L.) Plant Cell Reports 4, 78-80.
- MINAMIZAWA K., HIRANO H. (1973) Effects of the concentrations of several sugars on the differentiation in excised stem segments of mulberry tree cultivated *in vitro*. J. Seric. Sci. Jpn. 43(1), 51-57.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. plant. 15, 473-497.
- OHYAMA K. (1970) Tissue culture in mulberry tree. Jpn. Agric. Res. Q. 5, 30-34.
- OKA S., OHYAMA K. (1986) Mulberry (*Morus alba* L.) In: Bayaj Y.P.S. (ed) Biotechnology in agriculture and forestry. vol. 1, tree1, Springer-Verlog, Berlin.384-392p.
- PEREZ C., RODRIGUES R., TAMES R.S. (1985) *In vitro* filbert (*Corylus avellana* L.) micropropagation from shoot and cotyledonary node segments. Plant Cell Reports 4, 137-139.
- RAUBER M., GRUNEWALDT j. (1988) *In vitro* regeneration in *Allium* species. Plant Cell Reports 7, 426-429.
- REED B.M. (1991) Micropropagation of meadowfoam (*Limnanthes* spp) Plant Cell Reports 10, 94-96.
- ROYAN-SUBRAMANIAN S. (1965) The chromosomes of *Morus indica*, Linn. Current Sci 18, 539-540.
- SAITO H. (1992) *In vitro* propagation of mulberry through adventitious bud induction system. J. Seric. Sci. Jpn.61(1), 46-51.
- SEKI H., TAKEDA M., TSUTSOMI K., USHIKI Y. (1971) Studies on the callus culture of the mulberry tree. 1. The effect of concentration of auxin and kinetin on the callus cultures of the mulberry stem. J. Seric. Sci. Jpn. 40, 81-85.
- SINOTO Y. (1929) Chromosome studies in some dioecious plants, with special reference to the allosomes. Cytologia 1, 109-191.
- SKIRVIN R.M. (1981) Fruit crops in : Conger B.V. (ed.) Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques (pp51-139) CRC Press, Boca Raton.
- SUSHEELAMMA B.N., KUMAR J.S., DANDIN S.B., JOLLY M.S., SENGUPTA K., RAJU R. (1990) Karyomorphological studies in a few exotic varieties of genus *Morus* L. Cytologia 55, 107-114.
- THORPE T.A. (1983) Biotechnological applications of tissue culture to forest tree improvement. Biotech. Adv. 1, 263-278.
- YADAV U., MALAN L., JAISWAL V.S. (1990) Micropropagation of *Morus nigra* L., from shoot tip and nodal explants of mature trees Scientia Hort. 44(1-2), 61-67.