CULTIVO *IN VITRO* DE *Bauhinia forficata* Link

RICARDO NEVARES DE CARVALHO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 1998

CULTIVO *IN VITRO* DE *Bauhinia forficata* Link

RICARDO NEVARES DE CARVALHO

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **MURILO DE MELO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área de Concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Fevereiro - 1998

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

Carvalho, Ricardo Nevares de
Cultivo "in vitro" de *Bauhinia fortificata* Link (Unha-de-vaca) / Ricardo Nevares
de Carvalho. - - Piracicaba, 1998.

p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
Bibliografia.

1. Cultivo in vitro 2. Cultura de tecido 3. Planta medicinal 4. Unha-de-vaca I.
Título

CDD 583.323

CULTIVO *IN VITRO* DE *Bauhinia forficata* Link

RICARDO NEVARES DE CARVALHO

Aprovada em: 24.04.1998

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Murilo de Melo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Helaine Carrer

ESALQ/USP

Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho

ESALQ/USP

Prof. Dr. Murilo de Melo

Orientador

Ao Prof. Dr. Murilo de Melo pela sua valiosa orientação na obtenção deste grande título

À minha esposa Soraya e filhas Victória e Bárbara pelo amor e carinho.

Aos meus pais Luiz Felipe e Vera pela minha formação.

Aos meus irmãos Márcia e Eduardo, vovô Nano (*in memorium*), tios Fernando, Paulinho, Maurício, Jorge (*in memorium*) e Dalton e tias Lia, Tilinha, Sônia, Dóris e Heloísa pelo incentivo.

Às minhas avós Alice e Cyrene (*in memorium*) e tia Edna pelas orações

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos amigos Cássio Van der Berg, João Batista, Carlos Corsato, Carlo Corabi, Marcos Villanova e Jandir (*in memorium*) pela amizade e incentivo.

Aos amigos Romeu, Ênio, Amaral, Daniela Defávori, Humberto e Solizete pela amizade e ajuda durante os trabalhos.

Aos Professores Dr. Otto Jesu Crocomo, Leonardo Alves Carneiro, Luiz Antônio Gallo e Helaine Carrier pelas orientações.

À Sueli e Giovana Gallo pelo carinho com que nos ajudaram com a minha filha Victória.

Aos Professores Antônio Augusto Lucchesi, Antônio Natal Gonçalves, Antônio Roque Dechen, Beatriz Appezzato-da-Glória, Fabio Polggiani, Francisco de Mourão Fº, Marcílio de Almeida, Ricardo Ribeiro Rodrigues, Paulo Roberto de Camargo e Castro e Walter Radamés Accorsi pela instrução e ajuda durante o curso e a condução da dissertação.

À Marisa, Sílvia, Stela, Eliana, Kátia, Cristina, Márcia e outros funcionários da Biblioteca Central, da Biblioteca do CENA, da Seção de Pós-Graduação e das secretarias dos Departamentos de Química e da Fisiologia Vegetal.

Ao Centro de Biotecnologia de Plantas (CEBTEC) onde foi realizado o presente trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do presente projeto.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Botânica da <i>Bauhinia forficata</i>	4
2.2 Farmacologia de <i>Bauhinia</i> sp.	6
2.3 Fisiologia e bioquímica da <i>Bauhinia</i> sp.	7
2.4 Cultura de tecidos e balanço de fitorreguladores.....	9
2.5 Embriogênese.....	13
2.6 Cultura de tecidos de <i>Bauhinia</i> sp. e de outras <i>Leguminosae</i>	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Obtenção de explantes e assepsia.....	18
3.1.1 Obtenção de sementes e de explantes de partes vegetativas.....	18
3.1.2 Ensaios de assepsia.....	18
3.1.2.1 Assepsia e inoculação direta de sementes (Experimento 1).....	19
3.1.2.2 Assepsia de sementes e inoculação de embriões (Experimento 2).....	20
3.1.2.3 Extração, assepsia e inoculação de embriões (Experimento 3).....	20
3.1.2.4 Assepsia e inoculação de explantes de explantes vegetativos coletados no campo (Experimento 4).....	20
3.1.3 Assepsia das sementes e extração de embriões.....	21
3.1.4 Obtenção de partes vegetativas a partir de sementes germinadas <i>in vitro</i>	21
3.2 Meio de cultivo básico.....	22
3.3 Micropropagação.....	23
3.4 Enraizamento.....	24
3.5 Calogênese (Indução de calos).....	24

3.5.1	Indução de calos em meio de cultura contendo 2,4-D.....	24
3.5.2	Indução de calos em meio de cultura contendo BAP.....	24
3.5.3	Manutenção de calos em 2,4-D.....	25
3.6	Indução e desenvolvimento de embriões somáticos.....	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1	Ensaio de assepsia.....	26
4.1.1	Assepsia e inoculação direta de sementes (Experimento 1).....	26
4.1.2	Assepsia de sementes e inoculação de embriões (Experimento 2).....	27
4.1.3	Extração, assepsia e inoculação de embriões (Experimento 3).....	28
4.1.4	Assepsia e inoculação de explantes de explantes vegetativos coletados no campo (Experimento 4).....	28
4.1.5	Assepsia das sementes e extração de embriões.....	29
4.2	Micropropagação.....	29
4.3	Enraizamento de brotos de micropropagação.....	32
4.4	Indução de calos.....	34
4.4.1	Indução de calos em 2,4-D.....	34
4.4.2	Indução de calos em 6-BAP.....	36
4.5	Manutenção de calos.....	39
4.6	Embriogênese somática.....	40
5	CONCLUSÕES.....	42
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
	ANEXO.....	52

LISTA DE FIGURAS

		Página
1	Fluxograma dos ensaios de assepsia.....	19
2	Desenho de plântula de <i>B. forficata</i> da qual foram separados explantes vegetativos	22
3	Fluxograma do protocolo de propagação <i>in vitro</i> de <i>B. forficata</i>	23
4	Efeito do tempo e das concentrações de hipoclorito de sódio na assepsia em sementes de <i>B. forficata</i> (Experimento 1)	27
5	Efeito de BAP na indução de morfogênese em embriões zigóticos, ápices caulinares, segmentos nodais e de entre-nós de <i>B. forficata</i>	29
6	Morfogênese em embrião maduro de <i>B. forficata</i> após 60 dias de cultivo em meio suplementado com 0,2 mg/L (a - micropropagação) e 1,0 mg/L de BAP (b - organogênese)	31
7	Efeito de NAA e IBA na indução de enraizamento em brotações de <i>B. forficata</i>	32
8	Brotação de <i>B. forficata</i> enraizada em meio de cultura suplementado com 2,5 mg/L de NAA.....	33
9	Efeito de 2,4-D na calogênese em diferentes explantes de <i>B. forficata</i>	34
10	Efeito de BAP na calogênese em diferentes explantes de <i>B. forficata</i>	36
11	Calo organogênico de <i>B. forficata</i> formado (a) em segmento de entre-nó em meio com 2,0 mg/L de BAP; (b) em ápice caulinar em meio de cultura com 4,0 mg/L de 6-BAP.....	38
12	Calo com células embriogênicas obtido a partir de segmento de hipocótilo de <i>B. forficata</i> inoculado em meio de cultura com 2,5 mg/L de 2,4-D.....	39
13	Morfogênese induzida por 2,4-D a 2,5 mg/L em <i>B. forficata</i> (a) calo de embrião zigótico com embrióides e embriões somáticos; (b) embriões somáticos formados em calos de ápices.....	41

CULTIVO *IN VITRO* DE *Bauhinia forficata* Link

Autor: RICARDO NEVARES DE CARVALHO

Orientador: Prof. Dr. MURILO DE MELO

RESUMO

Diferentes explantes vegetativos de *Bauhinia forficata* Link foram inoculados *in vitro* para se estabelecer um protocolo de micropropagação com o uso de técnicas de cultura de tecidos. Para tanto, foi avaliado o efeito de diferentes fitorreguladores sobre estes explantes. Estabeleceu-se que os melhores explantes foram aqueles retirados a partir de tecidos da parte aérea (segmentos nodais e de entrenós) tanto para a indução de calos como para micropropagação. Os fitorreguladores ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6-Benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0,25 mg/L e 0,50 mg/L, respectivamente, foram eficientes na indução de calos em 30 dias após a inoculação. BAP na concentração de 0,25 mg/L foi eficaz na indução de micropropagação em 60 dias de cultivo e ácido indolbutírico (IBA) na concentração de 1,0 mg/L foi efetivo na indução do enraizamento em 40 dias de cultivo.

***IN VITRO* CULTURE OF *Bauhinia forficata* Link**

Author: RICARDO NEVARES DE CARVALHO

Adviser: Prof. Dr. MURILO DE MELO

SUMMARY

Different vegetative explants of *Bauhinia forficata* Link were inoculated *in vitro* in order to establish a micropropagation protocol. The effect of different plant growth regulators was evaluated in the explants. Explants from shoot (nodal segments and internode) showed the best responses for callus induction as well as for micropropagation. The phytohormones 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) acid and 6-benzilaminopurine (BAP) efficiently induced callus on concentrations of 0,25 mg/L and 0,50 mg/L, respectively, within 30 days after the inoculation. The BAP in a concentration of 0,25 mg/L was effective on the shoots induction within 60 days of culture. Indolbutyric acid (IBA) used on a concentration of 1,0 mg/L was effective on the root induction within 40 days of culture.

1 INTRODUÇÃO

A *Bauhinia forficata* Link, espécie pertencente à família das leguminosas, é conhecida como uma planta medicinal anti-diabética por apresentar efeitos comprovados clinicamente na redução da concentração de açúcar no sangue de pacientes diabéticos (Juliani, 1931). É popularmente denominada unha-de-vaca devido à forma bilobada das suas folhas. *B. forficata*, de origem brasileira, é encontrada em diferentes ambientes, tais como bordas de Mata Atlântica (Klein, 1979), margens de rios e de estradas, campos de Cerrado (Correa, 1984), áreas semi-áridas do Nordeste (Schacht et al., 1992) e áreas degradadas, principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro. A árvore, de grande altura, é coberta de espinhos e com flores brancas. O fruto apresenta-se na forma de vagem chata com muitas sementes.

As plantas produzem diversos tipos de compostos, em geral, subprodutos de suas vias metabólicas, supostamente com finalidade de proteção contra condições do meio ambiente ou insetos predadores. Muitos destes compostos denominados metabólitos secundários vêm sendo usados em diversas áreas de interesse para o homem, como conservantes e condimentos na alimentação, adoçantes naturais, óleos essenciais, inseticidas biológicos, tinturas de tecelagem, aromatizantes, perfumes e princípios ativos de produtos medicinais (Collins & Watts, 1983).

Apesar dos avanços das engenharia química e genética, a maioria destes compostos ainda não são sintetizados artificialmente ou com o auxílio de microorganismos. O desconhecimento da bioquímica destes compostos (sua composição

química e metabolismo), como na *B. forficata*, dificulta o aproveitamento das novas técnicas de engenharia genética e biologia molecular, inclusive a transferência de material genético entre plantas.

A coleta e extração direta da planta no seu ambiente natural não é recomendado devido a:

- a) Sua dispersão por áreas de floresta, muitas das quais em áreas de difícil acesso;
- b) Variação nos indivíduos dentro da população heterogênea, o que compromete o fornecimento dos compostos quantitativa e qualitativamente;
- c) Possível erradicação da espécie.

Uma alternativa é a domesticação da espécie. Devido a grande diversidade entre os indivíduos da espécie se torna necessário um programa de seleção de indivíduos mais produtivos e homogêneos para servirem de matrizes. Também serão necessárias experiências com populações homogêneas para se estudar os diversos fatores que atingirão o cultivo em escala comercial, como sistemas de manejo, exigências nutricionais e prováveis pragas e doenças que poderão afetar a cultura. Um programa destes exige um grande investimento inicial e tempo para se obter um retorno financeiro. A ausência de normas na utilização e comercialização de metabólitos vegetais pela medicina torna esta alternativa inexecutável a médio prazo.

Um programa de domesticação de uma espécie selvagem pode ser acelerado com o uso de técnicas de cultivo *in vitro*. As árvores lenhosas e semi-lenhosas possuem um ciclo vegetativo muito longo e grande variabilidade genética quando propagadas por sementes, o que induz certa irregularidade na quantidade e qualidade dos compostos secundários produzidos. A micropropagação permite a produção de grande quantidade de mudas clonadas com similar capacidade genética de produção de metabólitos secundários que a planta matriz, esta selecionada dentre as mais produtivas, permitindo a instalação de plantios comerciais.

Apesar da importância da *B. forficata*, ela tem sido pouco estudada e pouco se conhece da sua composição bioquímica e do seu metabolismo. Por isto, existem muitas especulações sobre qual ou quais os compostos que poderiam promover as propriedades que lhe são atribuídas. Costa (1942) estudou a *B. forficata*, da qual extraiu diversas substâncias, identificando quercetina entre outras. Outra análise feita por Miyake et al. (1986) confirmou os resultados de Costa (1942). Outras espécies do mesmo gênero, também conhecidas como anti-diabéticas em suas regiões endêmicas, têm sido estudadas e todas as análises têm constatado a presença de flavonóides, todos com estruturas semelhantes à da quercetina. Por isto, vários autores vêm especulando que a ação hipoglucêmica das *Bauhinia* sp. é causada pelos flavonóides e estes têm sido estudados.

No presente trabalho, foram executadas investigações com o uso de técnicas de cultura de tecidos objetivando a elaboração de um protocolo para micropropagação e multiplicação *in vitro* de *B. forficata* visando entender a morfogênese e criar novas alternativas para a propagação desta espécie de planta.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Botânica da *Bauhinia forficata* Link

A *B. forficata* pertence a um grupo de plantas, incluindo-se árvores e arbustos lenhosos e plantas trepadeiras (lianas) conhecidas como pata-de-vaca, pata-de-boi, unha-de-vaca, unha-de-boi ou unha-de-anta por causa da forma característica e singular das suas folhas, que reproduzem o desenho da pegada deixada no solo pelos bovinos e antas. A maioria das espécies deste gênero são exóticas, predominando nas regiões tropicais do planeta. As espécies exóticas foram introduzidas no Brasil para uso ornamental devido à forma incomum das suas folhas e às belas cores das suas flores que variam do lilás ao branco.

A *B. forficata* é uma espécie nativa pioneira presente em diversos tipos de ambientes, como florestas tropicais com altos índices pluviométricos e intensa competição pela luz (Ex: Mata Atlântica, Corrêa, 1984, e Floresta Amazônica, Costa, 1942), áreas semi-áridas das Regiões Centro-Oeste (Ex: Cerrado, Corrêa, 1984) e Nordeste (Ex: Caatinga, Schacht et al., 1992), destacando-se em margens de rios e estradas, clareiras, capoeiras, áreas com declividade, bordas de fragmentos florestais e áreas de mata secundária. Na mata densa e fechada, é difícil de ser encontrada, predominando em áreas alteradas pelo homem, fogo ou intempéries, sendo uma das primeiras espécies a se instalar, criando condições para que outras se estabeleçam e recomponham a flora nativa original. Tem, portanto, ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todo o Brasil (Costa, 1942; Corrêa, 1984; Schacht et al, 1992).

A *B. forficata* é uma leguminosa que, segundo a nova classificação proposta por Cronquist (1981, citado por Santos, 1994), pertence a família Caesalpiniaceae. Dentro do gênero *Bauhinia*, descrito em 1703 por Charles Plumier (citado por Santos, 1994), a espécie está classificada na seção *Pauletia*, divisão proposta por Benth (1870, citado por Santos, 1994). É caracterizada como uma espécie arbórea de crescimento rápido, atingindo um metro de altura em um ano, três a quatro metros de altura em quatro anos, chegando em até quinze metros de altura dentro da floresta tropical, com uma copa bem formada (Beltrati & Paoli, 1989). Caule não muito lenhoso e ramos finos e frágeis ou pendulares, com acúleos retos. Folhas membranáceas, palminérveas com nove nervuras principais e parcialmente divididas em dois lobos lanceolados.

As flores são hermafroditas, com cálice em tubo fino, corola dialipétala com cinco pétalas brancas, dez estames e ovário súpero, pubescente e estipitado. A floração na região de Campinas (SP) se estende de agosto a novembro, podendo se estender até fevereiro. A polinização parece ser noturna devido à sua flor ser de cor branca, grande e exposta acima da folhagem, características propícias à ação de morcegos (Santos, 1994). A frutificação ocorre de março a novembro, podendo variar a cada ano. O fruto é um legume oblongo, plano, seco, com ápice acuminado, de cor marrom de 15 a 20 centímetros de comprimento e com 8 a 10 sementes. O fruto se abre longitudinalmente com as valvas lenhosas enrolando-se helicoidalmente, permitindo que as sementes sejam lançadas até 15 metros da planta-mãe (Beltrati & Paoli, 1989). As sementes apresentam grande impermeabilidade à água, exigindo escarificação mecânica para a germinação.

A *B. forficata* apresenta a capacidade de se regenerar (constituir uma nova copa) a partir de raízes gemíferas que brotam em até 10 metros de distância da planta-mãe (do tronco principal) em áreas de cerrado após cinco meses de uma queimada (Rodrigues et al., 1990). Este estudo mostra a capacidade de sobrevivência desta espécie mesmo em áreas sujeitas a queimadas anuais do cerrado da Região Centro-Oeste.

2.2 Farmacologia de *Bauhinia* sp.

O homem sempre aprendeu os seus conhecimentos observando o que acontecia em sua volta (as relações entre os seres vivos e com o meio ambiente) e experimentando em si os objetos (animais, vegetais, minerais) ao seu alcance como alimento, remédio ou instrumento, muitas vezes com bons ou maus resultados. Por milênios, o homem vem utilizando extratos extensivamente e, neste século, compostos secundários isolados como aromatizantes, óleos, corantes, conservantes, perfumes, medicamentos, etc. Apesar das aplicações na indústria alimentícia e cosmética com grande retorno econômico, as aplicações na indústria farmacêutica têm tido maior destaque por envolverem curas de doenças endêmicas na humanidade.

Apesar dos recentes avanços na tecnologia de extração, nas técnicas de separação (cromatografia), na instrumentação analítica e na espectroscopia, sabe-se ainda muito pouco sobre o metabolismo secundário das espécies de plantas superiores, principalmente as presentes nas florestas tropicais. Muitas das espécies vegetais existentes nas regiões tropicais são ainda desconhecidas e nem sequer foram descritas botanicamente ou analisadas quimicamente (Balandrin & Klocke, 1988). Esta falta de conhecimento é preocupante à medida em que grandes extensões de ecossistemas tropicais são destruídas, extinguindo-se muitas espécies antes que sejam conhecidas e estudadas.

Tradicionalmente, a medicina popular tem-se difundido de forma verbal, com poucos registros científicos, perdendo-se assim muitas informações valiosas. Muitas vezes, a eficácia da medicina popular se mistura ao folclore, aparecendo na farmacopéia popular remédios e poções de eficácia duvidosa e não comprovada. No Brasil, é grande o número de infusões vegetais usados como remédios sem qualquer acompanhamento médico, comprovação de sua eficácia ou conhecimento de sua composição bioquímica.

Muitos autores falam em diversos usos terapêuticos, muitos sem alguma comprovação clínica ou terapêutica. Pereira (1929), Costa (1942), Cruz (1965) e Corrêa (1984) citaram o uso da unha-de-vaca no tratamento de lepra, elefantíase, mordeduras de cobras, morfêia, febres, doenças silifíticas, olhos inflamados, gonorréia, tosse, bronquites e afecções urinárias e propriedades como estimulante, diurética, anti-blenorrágica, vermífuga e purgativa, sem apresentarem qualquer comprovação clínica.

Só há um registro de estudo clínico do uso da *B. forficata*. Juliane (1931), conhecendo a fama da pata-de-vaca como planta anti-diabética, comprovou a sua eficácia através do acompanhamento clínico e exames laboratoriais de casos de glicosúria em que os pacientes foram tratados com chás de extrato de folhas de *B. forficata*. Todos os seus pacientes apresentaram redução da taxa de glicose no sangue. Observou que o efeito não era permanente e que, quando o tratamento era interrompido, os sintomas de diabetes voltavam. Após a redução na taxa de glicose no início do tratamento, o chá exercia uma função reguladora, mantendo baixo o teor de glicose no sangue. As observações de Juliane não atestaram a capacidade de reduzir a poliúria, mas esta vem sendo ressaltada na farmacognosia. Esta leguminosa não apresenta ação sobre os elementos nobres dos rins nem sobre os condutos ou reservatórios urinários (bexiga). É administrada sob forma de tintura, extrato fluído, infusão ou cozimento (Cruz, 1965). Segundo Machado (citado por Corrêa, 1984), a *Bauhinia* apresenta vantagens sobre a insulina por poder ser aplicada oralmente para o lactante, o infante e o adulto sem os cuidados exigidos que a última requer ao ser aplicada hipodermicamente. Apesar disto, pouco se estudou sobre a sua composição bioquímica e seu metabolismo.

2.3 Fisiologia e bioquímica de *Bauhinia* sp.

Os vegetais superiores possuem um sistema metabólico muito complexo, onde muitos compostos são sintetizados ou transformados na manutenção de suas funções vitais. Através de observações das relações entre os vegetais e os animais ou de

experiências empíricas, o homem vem descobrindo novas funções para os vegetais, muitas sem relação aparente com a própria sobrevivência dos mesmos. Muitos extratos vegetais têm sido usados para atender diversos interesses do homem, como produtos medicinais, aromatizantes, temperos, corantes, conservantes, repelentes, inseticidas, enzimas, etc... Os compostos que compõem estes extratos são denominados de compostos metabólicos primários ou secundários, dependendo do seu papel na vida do vegetal. Os compostos primários são aqueles que são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento fisiológico, sendo sintetizados e transformados no metabolismo presente em cada célula viva. Estão presentes em quase todos os seres vivos, em quase todos os seus órgãos, sendo acumulados em alguns destes (sementes, frutos e raízes). Destacam-se neste grupo carboidratos, açúcares, óleos, gorduras, ácidos graxos, entre outros, que são matérias-primas da indústria alimentícia (Balandrin & Clocke, 1988). Os metabólitos secundários são sintetizados a partir de um metabólito primário em uma via metabólica alternativa, sem função direta no crescimento e desenvolvimento fisiológico do vegetal. Estes compostos foram selecionados por meio de pressões evolutivas e são dispendiosos metabolicamente, só sendo sintetizados quando exigidos pelas condições adversas do meio ambiente às funções vitais normais do vegetal, desempenhando assim alguma função ecológica (Miachir, 1992). São encontrados na natureza em pequenas quantidades e de forma irregular, o que torna a sua extração, isolamento e purificação difícil (Balandrin & Clocke, 1988). Alguns metabólitos secundários são atrativos aos agentes polinizadores (insetos, pássaros, morcegos), repelentes ou tóxicos aos predadores (microorganismos, insetos, herbívoros) ou a outras plantas (parasitas, competidoras, ervas daninhas) (Whitaker & Hashimoto, 1986).

Diversos compostos considerados hipoglicêmicos têm sido identificados, mas poucos tiveram a sua eficácia comprovada isoladamente. Entre as diversas categorias de compostos orgânicos conhecidos, destacam-se flavonóides, alcalóides, glicosídeos e taninos. A maioria dos estudos estão voltados para a análise de flavonóides, já que diversos autores vêm sugerindo que esta classe de compostos é capaz de promover a

ação anti-diabética. Costa (1942) extraiu das folhas da *B. forficata* um glicosídeo (que propôs denominar de bauinosídeo) e traços de óleos essenciais, alcalóides e taninos. Identificou a presença de quercetina, glicose, ramnose, ácido tartárico e guanidina. Miyake et al. (1986) confirmou a presença de todas as substâncias separadas por Costa na *B. forficata*. Salatino (1976) fez análise bioquímica da cera da cutícula das folhas de *B. holophylla* Steud, uma planta do Cerrado, identificando a presença de quercetina, carboidratos, glicose, galactose, ramnetol, rhamnose, alcanos, ácido tartárico, taninos pirocatequímicos e óleo essencial *beta*-cariofileno.

2.4 Cultura de tecidos e balanço de fitorreguladores

Os extratos vegetais purificados são caros por causa de dois fatores principais (Miachir, 1992):

- a) O alto custo dos processos de isolamento e purificação dos compostos devido ao uso de equipamentos sofisticados e reagentes caros.
- b) O grande volume de material vegetal necessário para se obter uma quantidade comercial do produto porque a produção dos compostos metabólitos secundários é muito baixa na planta em seu meio ambiente.

A maioria das plantas produtoras de compostos de interesse medicinal ainda é explorada de forma extrativista, correndo o risco de serem extintas. O extrativismo não garante a quantidade e a qualidade do produto que atenda as exigências de um mercado crescente e que tem se tornado mais criterioso. São poucas as espécies domesticadas pelo homem, cultivadas de forma silvicultural ou agrônômica, com propagação vegetativa ou por sementes, utilizando adubação, irrigação e melhoramento de plantas. A domesticação tem tido problemas com queda ou, até mesmo, a não produção do composto desejado devido às alterações das condições do ambiente que estimulam a síntese (Tyller, 1988).

As técnicas de cultura de tecidos podem contribuir de diversas maneiras para viabilizar a exploração destas plantas produtoras de compostos de uso medicinal (Bajaj et al., 1988):

- a) Como um instrumento no melhoramento genético com a micropropagação e cultivo em condições especiais em pequena escala, objetivando selecionar plantas mais produtivas e mais adaptadas às condições de cultivo comercial;
- b) Como uma forma de produção de mudas em escala industrial com micropropagação e cultivo em condições especiais;
- c) Como forma de produção com o cultivo de células em suspensão com o objetivo de síntese do composto de forma similar a métodos fermentativos usados para microorganismos.

Micropropagação é a propagação asséptica utilizando meristemas, ápices caulinares ou radiculares e gemas adventícias, axilares ou laterais. Tem sido muito utilizada para a propagação em massa de plantas em lugar dos métodos convencionais por sementes ou mudas porque estes exigem tempo muito longo, há baixa taxa de germinação das sementes e de pegamento de mudas e grandes variações genéticas e fenotípicas em função de cruzamentos naturais e alterações ambientais. Muitas das plantas em estudo com fins medicinais são espécies arbóreas de grande porte e com sementes dormentes. A micropropagação proporciona maior disponibilidade de plantas em menos tempo que sob condições ambientais normais. É muito empregada na produção de mudas livres de patógenos e viroses (batata, citros, morango) e de mudas clonais geneticamente uniformes (espécies ornamentais e florestais). A cultura de tecidos permite estabilizar a produção de mudas ao longo do ano.

Organogênese é a propagação através da formação de órgãos adventícios produzidos a partir de tecidos somáticos (não meristemáticos), onde a planta é regenerada em etapas, alterando-se o balanço hormonal no meio de cultura. Há formação sequencial de brotos e raízes. Pode ser diretamente a partir do explante ou indireta, com a

formação de uma massa de células desdiferenciadas (calogênese) antes da regeneração da planta (Grattapaglia & Machado, 1990). Este método é mais lento, mas apresenta boa frequência de regeneração de plantas.

A embriogênese somática difere da micropropagação e da organogênese por apresentar formação de estruturas bipolares (capazes de formar parte aérea e raiz) com sistemas vasculares fechados (Schultheis et al., 1990), sem conexão com o tecido de origem, enquanto os outros processos apresentam estruturas polares (formam apenas ápices, ainda sendo necessária a indução de raízes) com conexão entre os seus sistemas vasculares e os dos tecidos de origem. Ainda que a lista de espécies reportadas seja longa, poucas espécies tiveram embriogênese somática estudada por cortes histológicos que mostrem a anatomia dos tecidos e que permitam a identificação dos tecidos vasculares.

Calogênese é o processo pelo qual a célula é induzida a formar uma massa de células desdiferenciadas. Tem a inconveniência de ser passível de indução de mutações e aberrações que podem só se manifestarem em campo no momento de se iniciar a produção (Illg, 1990). A partir destes calos formados, pode-se induzir a diferenciação de células desta massa celular em estruturas organizadas e funcionais (organogênese), a diferenciação em estruturas bipolares (embriogênese somática) ou cultivo em meio líquido (suspensões celulares) (Handro & Floh, 1990). A totipotencialidade das células vegetais é a capacidade das células individuais regenerarem plantas completas. Uma planta adulta é um sistema altamente diversificado, originário de uma única célula que contém todas informações genéticas. Apenas algumas células (meristemáticas) localizadas principalmente nos ápices caulinares e ápices radiculares mantém o processo de divisão na planta adulta. Todas as células (somáticas), embora estejam diferenciadas e especializadas, ainda possuem capacidade de regeneração de plantas quando adequadamente induzidas.

A capacidade de regeneração de partes perdidas quando estas são destacadas ou destruídas depende de um balanço das concentrações dos hormônios endógenos da planta. Cada classe de hormônio possui funções que regulam o desenvolvimento da planta. As auxinas, produzidas nos ápices caulinares, e as citocininas, estas produzidas nos ápices radiculares, são responsáveis por este controle hormonal (Jacobsen, 1983).

As auxinas produzidas no ápice caulinar e em outras regiões de crescimento ativo são translocadas com a seiva "elaborada" (compostos de carbono) em direção à raiz, inibindo o desenvolvimento dos brotos secundários e estabelecendo uma dominância apical. Atuam no crescimento do caule, das folhas e da raiz, na atividade cambial de plantas lenhosas, no desenvolvimento e crescimento da flor, no crescimento e abscisão do fruto e na senescência e abscisão foliar. A presença de auxina como ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (NAA) e ácido indolbutírico (IBA) em concentrações baixas estimula a formação de raízes ou, em maiores concentrações, a desdiferenciação celular e formação de calos (calogênese) ou embriões somáticos (embriogênese). Por outro lado, a destruição do ápice caulinar cessa a formação de auxina, reduzindo a relação auxina/citocinina e favorecendo o desenvolvimento de novos brotos com a interrupção de inibição das gemas axilares pela auxina.

As citocininas estimulam a divisão, o alongamento, a diferenciação celular, a germinação e retardam a senescência. São poucas as citocininas naturais identificadas e purificadas. Existem hormônios de origem sintética que podem regular o desenvolvimento de célula individualizada ou de porções de tecidos ou órgãos usados como explante em cultivo *in vitro* substituindo as citocininas naturais. Com a redução ou remoção de auxina e adição de citocininas como cinetina (Kin) e 6-benzilaminopurina (BAP), induz-se organogênese (desenvolvimento de pequenos brotos) ou embriogênese (formação de embriões) (Skoog, 1971, citado por Jacobsen, 1983). Quando há perda do sistema radicular, a produção de citocinina é interrompida, gerando uma maior relação auxina/citocinina e estimulando a formação de novas raízes (Ferri, 1975).

As técnicas de micropropagação possibilitam a seleção de plantas mais produtivas e mais resistentes a pragas, doenças e herbicidas (Mantel et al., 1994; Gallo & Crocomo, 1995). Outros usos da micropropagação possíveis são na manutenção de bancos de germoplasma e na manipulação das vias metabólicas visando uma maior síntese de metabólitos de interesse (Yamada & Fujita, 1983).

2.5 Embriogênese

A auxina é o mais importante fator de regulação da indução e desenvolvimento da embriogênese, sendo o 2,4-D a auxina mais empregada (60% dos trabalhos publicados) (Ammirato, 1983). Inicialmente, o tecido explantado sofre processo de dediferenciação, voltando ao estadio meristemático, no qual sofre seguidas divisões celulares. As novas células formam uma massa de células desorganizadas denominada de calo. Estes calos podem tornar-se embriogênicos, dependendo de diversos fatores ainda não totalmente esclarecidos. No início do desenvolvimento dos calos de células embriogênicas, os calos devem apresentar as seguintes características: calos friáveis, macios, com células agrupadas sem apresentarem estrutura rígida ou organizada. Um exame detalhado em microscópios especiais permite o reconhecimento de pequenas estruturas organizadas sobre a superfície dos calos, revelando a presença de embriões e embrióides em diversos estádios de desenvolvimento. Culturas friáveis mantêm o potencial embriogênico e a capacidade de produção de grande número de embriões somáticos por até dois anos (Yasuda, 1985, citado por Grattapaglia, 1990).

Desenvolvimento dos embriões somáticos é induzido pela transferência do calo para meios com menores teores de auxina ou sem este fitohormônio. Auxina em grandes concentrações pode inibir o desenvolvimento do embrião. Outros fitohormônios podem ser utilizados em combinações com auxina como citocininas, ácido abscísico e ácido giberélico para melhorar o desenvolvimento dos embriões somáticos (Ammirato, 1983). Nos primeiros trabalhos de embriogênese somática, os meios utilizados eram meios

líquidos. Em trabalhos recentes, notou-se que os embriões se desenvolvem mais em meio líquido do que em meio sólido (Ammirato, 1983). A densidade de estruturas embriogênicas no meio de cultura mostrou-se que é inversamente proporcional ao desenvolvimento dos embriões somáticos (Halperin, 1967, citado por Ammirato, 1983). Substâncias liberadas pelos explantes no meio têm efeito inibitório, como os compostos fenólicos (Grattapaglia & Machado, 1990). Diversos reguladores de crescimento têm sido adicionados no meio de regeneração de plantas (ou germinação de embriões). Nos processos de embriogênese somática, o meio MS (Murashige & Skoog, 1962), na forma original ou modificada (alterando a concentração de sais e/ou das vitaminas), responde por 70% dos meios utilizados nas espécies estudadas (Ammirato, 1983).

2.6 Cultura de tecidos de *Bauhinia* sp. e de outras *Leguminosae*

Kumar (1992) regenerou plantas de *Bauhinia purpurea* L. por organogênese indireta (via formação de calos) a partir de segmentos de caule coletados de árvores adultas. Em meios MS sólidos com 30 g/L de sacarose, induziu a formação de calos com 2,21 mg/L de 2,4-D. Em 15 dias formaram-se calos e após 45 dias obtiveram-se massas de calos friáveis branco-esverdeados. Experimentou seis níveis de cinetina e seis níveis de NAA, isolados ou em combinação, para induzir brotação e formação de raízes nos calos. Para brotações, obteve-se melhores resultados com 1,08 mg/L de Kin ou em combinação com 0,09 mg/L de NAA, obtendo respectivamente 78 e 50 % dos calos formando 4 a 6 brotos por calo após 15 a 20 dias de subcultura. Níveis mais altos de Kin reprimem a diferenciação de brotações adventícias. Com 0,93 mg/L de NAA, conseguiu 62 % de calos com raízes em 15 dias de subcultura. A combinação entre Kin e NAA reduziu a calogênese, apresentando um efeito antagônico entre os fitohormônios, já observado em *Dalbergia sissoo* (Kumar et al., 1991). Brotações isoladas transferidas para meio MS com 0,93 mg/L de NAA desenvolveram raízes e pequenos calos na base após 30 dias.

Mathur & Mukunthakumar (1992) regeneraram plantas de *Bauhinia variegata* L. por micropropagação a partir de segmentos de caule retirados de árvores adultas. Em meios MS sólidos com 30 g/L de sacarose, experimentou sete níveis de BAP para brotação e cinco níveis de IBA para enraizamento. Obtiveram melhores resultados com 3,0 mg/L de BAP, produzindo 7,8 brotos por explante, e com 1,0 mg/L de IBA, obtendo-se enraizamento de 96 % dos brotos, cada um com 4,6 raízes em média.

Upreti & Dhar (1996) regenerou plantas a partir de segmentos nodais cotiledonários de *Bauhinia vahlii* Wight & Arnott. Experimentou 4 formulações de meio de cultura sólido e 4 citocininas (BAP, Kin, Zeatina (Zea) e thidiazuron (TDZ)) em 3 níveis de concentração para micropropagação e 2 auxinas (NAA e IBA) em 4 níveis de concentração para enraizamento. Os melhores resultados foram obtidos em meios MS com 0,2 mg/L de TDZ, obtendo-se 96% dos explantes com brotações e 5,5 brotações por explante. Obtiveram 55% dos explantes enraizados em meios MS com 0,2 mg/L de NAA.

Gharyal & Maheshwari (1982) regeneraram plantas de *Albizia lebbeck* L. por organogênese direta e indireta a partir de hipocótilos, raízes, cotilédones e folhas coletados de plântulas de sementes germinadas *in vitro*. Em meios "B5" (Gamborg et al., 1968) sólidos com suplemento de 2 mg/L das auxinas NAA, IAA e 2,4-D em combinação com 0,5 mg/L da citocinina BAP, as auxinas NAA e IAA foram mais efetivas que o 2,4-D. Os brotos foram formados direta e indiretamente (via calos) após 6 semanas. Posteriormente, em meio sem fitorreguladores ou com 2 mg/L de IAA, 45-50 % dos brotos enraizaram.

Gharyal & Maheshwari (1990) regeneraram plantas de *Albizia lebbeck* L., *Cassia fistula* L. e *Cassia siamea* L. por organogênese direta e indireta a partir de segmentos de caule e pecíolos coletados de árvores adultas. Em meios "B5" (Gamborg et al., 1968) com suplemento de FeEDTA, 20 g/L de sacarose e 8 g/L de ágar, 2 mg/L das auxinas NAA e

IAA em combinação com 0,5 e 1 mg/L da citocinina 6-BAP. As auxinas NAA e IAA foram mais efetivas que o 2,4-D. Em meio com 2 mg/L de NAA e 0,5 mg/L de 6-BAP, 100 % dos caules e 14 % dos pecíolos de *A. lebbeck* formaram calos. Em meio com 0,5 mg/L de IAA e 1 mg/L de 6-BAP, 100 % dos caules e 36 % dos pecíolos de *A. lebbeck* formaram calos com formação de inúmeras brotações em dois meses. Os brotos foram transferidos para enraizarem em meios sem fitohormônios ou com 2 mg/L de IAA, resultando em 45-50 % de enraizamento.

Tomar & Gupta (1988) regeneraram plantas de *Albizia richardiana* King por organogênese direta e indireta e por embriogênese somática a partir de segmentos com 1 mm e 10 mm de comprimento de hipocótilos coletados de plântulas de sementes germinadas *in vitro* e inoculados meios "B5" sólidos suplementados com cinco concentrações de BAP. Com concentrações de até 2 mg/L de BAP, houve um aumento gradativo no percentual de explantes com brotações (máximo: 52,2 % em 40 dias) e no número de brotos por explante (máximo: 1,6 brotos por explante). Acima de 2 mg/L de BAP, houve inibição total de micropropagação. Em geral, explantes de 1 mm não desenvolveram brotação, mas produziram quantidades maiores de calos com o aumento de concentração de BAP. Durante dois anos subsequentes, houveram 15 subculturas de manutenção dos calos formados. No máximo, obteve-se 13,6 % de calos embriogênicos após indução com 2 mg/L de BAP (4a. subcultura), e a média geral foi de 5,29 % (60 calos embriogênicos, cada um formando 3,68 embriões somáticos). No mesmo período, obteve-se até 9,8 % de calos organogênicos após indução com 0,2 mg/L de BAP (7a. subcultura) e a média do período foi de 3,46 % (39 calos organogênicos, cada um formando 3,41 brotos).

Rahman et al. (1993) regeneraram plantas de *Caesalpinia pulcherrima* Sw. por micropropagação a partir de segmentos de caule com gemas axilares retirados de árvores adultas. Em meios MS sólidos, testaram várias auxinas (IAA, NAA, 2,4-D e IBA) e citocininas (BAP e Kin), isoladas ou em combinações entre si, em concentração padrão

de 1 mg/L do fitohormônio. Em três semanas de cultura, os explantes proliferaram calos e calos com brotações. O 2,4-D isolado ou em combinação com outros fitorreguladores (exceto BAP) induziu calogênese. NAA sozinho também induziu calos. Todos os outros meios induziram o desenvolvimento de brotações múltiplas com formação de calos na sua base. NAA em combinação com as citocininas apresentou 100 % de brotações e IAA também em combinação com as citocininas favoreceu um enraizamento máximo. BAP com NAA produziu o maior número de brotações por explante e Kin com IAA produziu o maior número de raízes por explante. Após seis semanas, as brotações foram cultivadas em meios com BAP e NAA para alongamento e transferidas para meios MS contendo 1 mg/L de IAA para indução de raízes adventícias, obtendo-se 65 % de enraizamento após três semanas.

Mathur & Mukunthakumar (1992) regeneraram plantas de *Parkinsonia aculeata* L. por micropropagação a partir de segmentos de caule retirados de árvores adultas. Em meio MS sólido contendo 30 g/L de sacarose, experimentou seis níveis de BAP para brotação e quatro níveis de IBA para enraizamento. A formação de raízes foi precedida da formação de calos compactos brancos na base do broto em todos os níveis. Obtiveram melhores resultados com 2,0 mg/L de BAP, produzindo 11,2 brotos por explante, e com 2,0 mg/L de IBA, formando raízes em 88 % dos brotos, apresentando 5,3 raízes por broto em média.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), Departamento de Química, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)/USP, em Piracicaba, São Paulo.

3.1 Obtenção de explantes e assepsia

3.1.1 Obtenção de sementes e de explantes de partes vegetativas

As sementes e explantes de partes vegetativas de *Bauhinia forficata* Link foram coletadas em diversos locais de mata nativa, muitas de formação secundária, isto é, áreas desmatadas que foram naturalmente recompostas, em diferentes pontos dentro do Campus da ESALQ e em áreas próximas ao Município de Piracicaba.

3.1.2 Ensaios de assepsia

Iniciou-se a cultura de tecidos vegetais de *B. forficata* com a imersão de sementes e de explantes vegetativos retirados no campo em solução com 0,5% de hipoclorito (v/v) e em solução com 30% de etanol (v/v) e três lavagens em água destilada autoclavada. Foram observadas contaminações por fungos e bactérias. Em virtude destes fatos, foram realizados diversos ensaios objetivando-se estabelecer um tratamento de assepsia para material colhido no campo, como mostra a Figura 1.

Figura 1. Fluxograma dos ensaios de assepsia

3.1.2.1 Assepsia e inoculação direta das sementes (Experimento 1)

As sementes de *B. forficata* foram tratadas por imersão em soluções de hipoclorito de sódio a 0,5; 1,0 e 1,5% (v/v) por 5, 10, 15 e 30 minutos e tratadas por imersão em solução de etanol a 70% (v/v) por 3 minutos. Os tratamentos de controle foram conduzidos utilizando-se água destilada autoclavada em substituição ao hipoclorito de sódio e/ou ao etanol. Após os tratamentos, as sementes foram inoculadas diretamente, ainda sob condições estéreis, em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS (Murashige & Skoog, 1962). sólido com 30g/L de sacarose e 2,3g/L de “Gelrite” em câmara da inoculação asséptica com 10 repetições.

3.1.2.2 Assepsia de sementes e inoculação de embriões (Experimento 2)

As sementes de *B. forficata* foram tratadas por imersão em soluções de hipoclorito de sódio a 0,5; 1,0 e 1,5% (v/v) por 5, 10, 15 e 30 minutos e tratadas por imersão em solução de etanol a 70% (v/v) por 3 minutos. Os tratamentos de controle foram conduzidos utilizando-se água destilada autoclavada em substituição ao hipoclorito de sódio e/ou ao etanol. Após os tratamentos das sementes, embriões de *B. forficata* foram extraídos das sementes e inoculados, sob condições estéreis, em meio de cultura ½ MS sólido com 30g/L de sacarose e 2,3g/L de “Gelrite” em câmara da inoculação asséptica com 10 repetições.

3.1.2.3 Extração, assepsia e inoculação de embriões (Experimento 3)

Embriões foram extraídos em laboratório em condições não estéreis de sementes de *B. forficata* coletadas no campo e foram tratados por imersão em soluções de hipoclorito de sódio a 0,2 e 0,5% (v/v) por 5, 10 e 20 minutos e tratadas por imersão em soluções de etanol a 50 e 70% (v/v) por 1 e 3 minutos em câmara de inoculação esterilizada. Os tratamentos de controle foram conduzidos utilizando-se água destilada autoclavada em substituição ao hipoclorito de sódio e/ou ao etanol. Os embriões tratados foram inoculados em meio de cultura ½ MS sólido com 30g/L de sacarose e 2,3g/L de “Gelrite” em câmara da inoculação asséptica com 10 repetições.

3.1.2.4 Assepsia e inoculação de explantes vegetativos coletados no campo (Experimento 4)

Ramos de *B. forficata* coletados no campo foram segmentados, dos quais separou-se ápices caulinares, folhas novas, segmentos do limbo de folhas adultas e segmentos de caules herbáceos com ou sem gemas como explantes vegetativos. Estes explantes foram tratados por imersão em soluções de hipoclorito de sódio a 0,2 e 0,5%

(v/v) por 5, 10 e 20 minutos e tratadas por imersão em soluções de etanol a 50 e 70% (v/v) por 1 e 3 minutos em câmara de inoculação esterilizada. Os tratamentos de controle foram conduzidos utilizando-se água destilada autoclavada em substituição ao hipoclorito de sódio e/ou ao etanol. Os explantes tratados foram inoculados em meio de cultura ½ MS sólido com 30g/L de sacarose e 2,3g/L de “Gelrite” em câmara da inoculação asséptica com 10 repetições.

3.1.3 Assepsia das sementes e extração de embriões

Em função dos resultados obtidos nos experimentos de assepsia (Experimentos 1, 2 e 3), foi estabelecido como melhor forma de assepsia de sementes e de obtenção de embriões desinfectados de *B. forficata* o tratamento de desinfecção das sementes por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1,5% (v/v) por 30 minutos e em solução de etanol a 70% (v/v) por 3 minutos, 3 lavagens em destilada autoclavada e a extração dos embriões das sementes tratadas em câmara de inoculação desinfectada. Este tratamento de assepsia foi adotado para a obtenção dos explantes necessários para o protocolo de propagação *in vitro* da *B. forficata*.

3.1.4 Obtenção de partes vegetativas a partir de sementes e embriões germinados *in vitro*

Foram germinados embriões *B. forficata* em meio de cultura ½ MS sólido obtendo-se plântulas sob condições estéreis. Retirou-se ápices caulinares, folhas maduras, segmentos de caule com (segmentos nodais) ou sem gemas axilares (entrenós), segmentos da região abaixo do cotilédono (denominado de hipocótilo), segmentos de raízes e ápices radiculares como explantes (ver Figura 2).

Figura 2. Desenho de uma plântula de *B. forficata* formada *in vitro* da qual foram separados explantes vegetativos.

3.2 Meio de cultivo básico

Os meios de cultura $\frac{1}{2}$ MS foram preparados com 50% das concentrações de sais minerais e vitaminas da formulação do meio de Murashige & Skoog (1962). Estes meios foram acrescidos com 30 g/L de sacarose e 2,3 g/L de “Gelrite” (meio sólido). Fitorreguladores foram acrescentados em apropriadas concentrações de acordo com o experimento realizado. Os experimentos foram conduzidos sob fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro) e temperatura de 25-28 °C. A Figura 3 mostra o fluxograma dos experimentos de cultivo *in vitro* com explantes de *B. forficata*.

Figura 3. Fluxograma do protocolo de propagação *in vitro* da *B. forficata*

3.3 Micropropagação

Foram realizados experimentos em meio $\frac{1}{2}$ MS sólido acrescido de benzilamino-purina (BAP) em nove níveis de concentração (0; 0,10; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 10 mg/L) para induzir a formação de brotações e partes aéreas a partir de embriões zigóticos, ápices caulinares, folhas maduras, segmentos de caule com (segmentos nodais) e sem gemas axilares (entrenós), segmentos da região abaixo do cotilédone (denominado de hipocótilo), segmentos de raízes e ápices radiculares de plântulas de *B. forficata* formadas *in vitro*, cada qual com vinte repetições com quatro explantes.

3.4 Enraizamento

Foram realizados experimentos em meio $\frac{1}{2}$ MS sólido sem fitorreguladores ou acrescido de ácido indolbutírico (IBA) em três níveis (1,0; 2,5 e 5,0 mg/L) ou de ácido naftalenoacético (NAA) em seis níveis (0,10; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg/L) para indução de formação de raízes. Foram utilizados brotos de *B. forficata* formados em experimentos de micropropagação em 6 repetições com 5 brotos/repetição.

3.5 Calogênese (Indução de calos)

3.5.1 Indução de calos em meio de cultura contendo 2,4-D

Foram montados experimentos em meio $\frac{1}{2}$ MS sólido acrescido de oito níveis (0; 0,10; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10 mg/L) de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) usando como explantes embriões zigóticos, ápices caulinares, folhas maduras, segmentos de caule com (segmentos nodais) e sem gemas axilares (entrenós), segmentos da região abaixo do cotilédone (denominado de hipocótilo), segmentos de raízes e ápices radiculares retirados de plântulas de *B. forficata* formadas *in vitro*, com 20 repetições com 4 explantes/repetição.

3.5.2 Indução de calos em meio de cultura contendo BAP

Com base nos resultados dos experimentos de micropropagação em presença de BAP nos quais ocorreu indução de calogênese, foram conduzidos experimentos em meio $\frac{1}{2}$ MS sólido acrescido de oito níveis (0; 0,10; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6 e 10 mg/L) de BAP usando como explantes embriões zigóticos, ápices caulinares e radiculares, folhas maduras e segmentos nodais, de entrenós, de hipocótilo e de raízes retirados de plântulas de *B. forficata* formadas *in vitro*, com 20 repetições com 4 explantes/repetição.

3.5.3 Manutenção de Calos em 2,4-D

Os calos de *B. forficata* formados em experimentos com variáveis concentrações de 2,4-D foram mantidos em meio ½ MS sólido acrescido de 2,5 mg/L de 2,4-D com transferências a cada cinco semanas.

3.6 Indução e desenvolvimento de embriões somáticos

Os calos de *B. forficata* friáveis, cor creme ou pardo-esverdeados claros, com grânulos verdes foram descritos como calos embriogênicos (Figura 14). Estes calos foram transferidos para meio ½ MS sólido em ausência de fitorreguladores. Após quatro semanas, parte dos calos em meio sólido sem fitorreguladores foi transferida para meio ½ MS líquido sem fitorreguladores para individualização e desenvolvimento de embriões somáticos. Após duas semanas, os calos e embriões somáticos individualizados em meio líquido foram transferidos para meio ½ MS sólido sem fitorreguladores para testes de germinação.

Como muitos embriões somáticos de *B. forficata* não se desenvolveram formando plântulas completas, foram testados quatro níveis (0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 mg/L) dos reguladores de crescimento ácido indolacético (IAA), cinetina (Kin) ou ácido giberélico (GA₃) em meio ½ MS sólido e utilizando embriões somáticos obtidos *in vitro* com 6 repetições com 10 embriões/repetição. O uso dos ácidos indolacético e giberélico objetivaram a formação da planta completa e o uso da cinetina teve como objetivo a formação de partes aéreas não deformadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio de assepsia

4.1.1 Assepsia e inoculação direta das sementes (Experimento 1)

A Figura 4 mostra o efeito do tempo de imersão e das concentrações de hipoclorito de sódio em tratamentos de sementes nos quais as mesmas foram tratadas com etanol. Em todos os tratamentos nos quais não se fez imersão das sementes de *Bauhinia forficata* Link em solução de etanol a 70%, independente do tempo de imersão e das concentrações de hipoclorito de sódio empregadas, todas as sementes foram contaminadas por fungos e bactérias, mostrando a importância do tratamento em etanol para a assepsia. Concentrações baixas (0,5%) de hipoclorito foram insuficientes para a assepsia adequada. Concentrações intermediárias (1,0%) exigiram um tempo maior que 30 minutos de imersão para assepsia adequada. Tratamentos com concentrações maiores (1,5%) de desinfetante apresentaram maior eficiência (menor contaminação) à medida em que se aumentou o tempo de imersão.

Durante a inoculação de sementes (experimento 1) e embriões de *B. forficata* (experimento 2), muitas sementes permaneceram muito tempo imersas em água. Os embriões extraídos destas sementes pareceram embebidos e apresentaram contaminações. A longa permanência das sementes em água destilada e autoclavada favorece embebição e ruptura do tegumento, causando a contaminação do embrião. Tratamento em hipoclorito por muito tempo também provoca ruptura do envoltório das sementes,

expondo o embrião às contaminações do meio ambiente. Maiores concentrações do desinfetante também contribuem por favorecerem a ruptura da casca. A maneira de manipulação das sementes e dos embriões durante e após a extração contribuem para o aumento percentual de contaminação nos processos *in vitro*.

Figura 4: Efeito do tempo e das concentrações de hipoclorito de sódio na assepsia em sementes de *B. forficata*. O gráfico apresenta apenas os tratamentos nos quais as sementes foram também tratadas com etanol a 70%. Os valores representam percentual de sementes que não contaminaram (10 repetições) em 14 dias de cultura (Experimento 1).

4.1.2 Assepsia de sementes e inoculação de embriões (Experimento 2)

Os embriões de *B. forficata* extraídos de sementes sob condições estéreis com ou sem tratamento de descontaminação superficial não apresentaram contaminação em meio de cultura, sugerindo-se que o tegumento da semente proporciona um ambiente interno sem presença de patógenos. O tratamento superficial das sementes é suficiente para se obter embriões livres de patógenos quando são extraídos sob condições não estéreis.

4.1.3 Extração, assepsia e inoculação de embriões (Experimento 3)

Quando os embriões foram extraídos em condições não assépticas e posteriormente tratados com produtos para desinfecção superficial, houve de forma aleatória o desenvolvimento de 50 % dos explantes e o restante dos embriões, durante a extração sofreram contaminação ou os mesmos não se desenvolveram sugerindo alguma toxidez nas concentrações usadas dos produtos aplicados nos tratamentos de desinfecção.

4.1.4 Assepsia e inoculação de explantes vegetativos coletados no campo (Experimento 4)

Os explantes de partes vegetativas de *B. forficata* apresentaram contaminações genéricas quando inoculados no meio de cultura, mesmo após tratamentos mais severos com etanol a 70% e hipoclorito de sódio. Os explantes certamente continham microorganismos endógenos que se manifestaram sob condições estéreis no meio de cultura, sugerindo ser necessário o uso de antibióticos e fungicidas sistêmicos capazes de se translocarem dentro dos explantes para a redução nos índices de contaminação. Em Tratamentos com 0,5% de hipoclorito, 5-10% dos ápices e segmentos do caule não se contaminaram, mas não se desenvolveram, sugerindo intoxicação ou toxidez aos produtos aplicados na desinfecção.

Considerando as dificuldades encontradas em se conseguir baixos índices de contaminação quando se utilizou os diferentes tipos de explantes vegetativos coletados no campo, optou-se pela utilização de explantes obtidos de plântulas formadas a partir de sementes germinadas *in vitro*. Os explantes se desenvolveram bem nos diversos experimentos realizados e apresentaram baixo índice de contaminação.

4.2 Micropropagação

Os resultados do efeito das concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) na indução de micropropagação em explantes de *B. forficata* estão na Figura 5. Os segmentos nodais e de entrenó formaram brotações adventícias de forma proporcional ao aumento na concentração de BAP até o nível de 0,5 mg/L do fitorregulador no meio de cultura, enquanto os ápices caulinares e embriões zigóticos apresentaram esta proporção até o nível de 1,0 mg/L. Houve maior número de brotações formadas em explantes de ápices caulinares, de segmentos nodais e de entrenó em meios contendo de 0,25 a 1,0 mg/L. Embriões zigóticos formaram mais brotações sob concentrações médias (0,5 a 2,0 mg/L) do fitorregulador. Apenas 1 ou 2 ápices radiculares entre 40 explantes formaram brotações e todos os segmentos de hipocótilo, de raiz e folhas formaram calos, mas não formaram brotações (resultados não apresentados).

Figura 5. Efeito de BAP na indução de morfogênese em embriões zigóticos, ápices caulinares, segmentos nodais e de entrenó de *B. forficata*. Valores representam número de brotações formadas e individualizadas (20 repetições) após 60 dias de cultura.

Estes experimentos utilizando BAP para indução de micropropagação apresentaram resultados que causaram alguma dificuldade de interpretação. Sob a ação de baixas concentrações de fitorregulador (até 2,0 mg/L), observou-se um ligeiro entumescimento dos explantes no local dos cortes com reduzida formação de calos. As plantas foram formadas diretamente a partir dos tecidos dos explantes de origem, caracterizando assim uma micropropagação propriamente dita ou organogênese direta, com maior frequência nos tratamentos contendo até 1,0 mg/L de BAP (Figura 6a). Houve concomitantemente, principalmente nos tratamentos com maiores concentrações de BAP, a formação de calos e brotações adventícias diretamente a partir de explante de *B. forficata* sugerindo a ocorrência de organogênese indireta. Resultados semelhantes foram observados em tecido de hipocótilo de *Linum usitatissimum* L. em meios contendo baixa concentração de BAP (0,05 mg/L) (Kaul & Williams, 1987).

Um segundo processo de formação de plantas foi observado em níveis de fitorreguladores acima de 2,0 mg/L, com um máximo na quantidade de plantas formadas em concentração de BAP ao redor de 4,0 mg/L (Figura 5). Nestes tratamentos, quase sempre ocorreu formação de calos friáveis, como em meios com 2,4-D, com formação de parte aérea a partir destes calos (Figura 6b) que, após exame mais acurado, caracterizaram-se uma micropropagação via organogênese (Appezzato-da-Glória, et al.)¹. Este tipo de formação foi observado em cotilédones de *Sesbania grandiflora* cultivados em meio de cultura contendo 1 mg/L de BAP e 1 mg/L de NAA (Detrez et al., 1984) e em pecíolos de beterraba açucareira (*Beta vulgaris*) cultivados em meio contendo 2,25 mg/L de BAP (Ritchie et al., 1989). O desenvolvimento das brotações foi acompanhado por cortes citológicos onde se observou a formação de novos grupos de células meristemáticas. Isto sugere a formação de parte aérea onde não existiam gemas dormentes, como nos segmentos de entrenó e de hipocótilo, caracterizando-se portanto uma propagação via organogênese quando se utilizou estes tecidos como explante. Para

¹ APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; MELO, M.; MELLO, M.O. (ESALQ/USP, Piracicaba, SP). Não publicado.

esclarecer esta situação, deve-se incluir a prática de cortes citológicos durante o cultivo em meios para micropropagação, com amostragem diária para acompanhamento da morfogênese.

A *B. forficata* é uma planta com boa capacidade de regeneração, como Rodrigues et al. (1990) já havia descrito em campos de cerrado, onde rebrota a partir do seu sistema radicular após uma queimada embora em condições de cultivo *in vitro*, explantes do sistema radicular apresentaram baixa regeneração. Os melhores resultados para a micropropagação foram obtidos a partir de explantes da parte aérea (segmentos de caule e ápices caulinares).

Figura 6. Morfogênese em embrião maduro de *B. forficata* após 60 dias de cultivo em meio suplementado com 0,2 mg/L (a - micropropagação) e 1,0 mg/L de BAP (b - organogênese).

4.3 Enraizamento de brotos de micropropagação

A Figura 7 mostra o efeito dos diferentes meios no enraizamento de partes aéreas obtidas nos experimentos de micropropagação. O ácido naftalenoacético (NAA) induziu a formação de raízes em 40 % dos brotos de *B. forficata* em meios contendo 5,0 mg/L. Nas outras concentrações testadas, a média foi de 20 % dos brotos testados. O ácido indolbutírico (IBA) estimulou o enraizamento em 40 % dos brotos em meios contendo 1,0 mg/L e 10 % nos demais níveis. Nos meios sem fitorreguladores, somente um dos 30 brotos enraizou. Os brotos podem ter sido afetados durante a inoculação devido ao estresse que sofrem durante a separação dos agrupamentos de brotações. Esta espécie mostrou facilidade de enraizamento por formar raízes em meios com auxinas diversas (NAA, IBA e 2,4-D). A Figura 8 mostra uma brotação de *B. forficata* enraizada em meio com NAA.

Figura 7. Efeito de NAA e IBA na indução de enraizamento em brotações de *B. forficata*. Os valores representam percentual de explantes que formaram raízes (30 repetições) em 40 dias de cultura.

Figura 8. Brotação de *B. forficata* enraizada em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 2,5 mg/L de NAA.

4.4. Indução de calos

4.4.1 Indução de calos em meio de cultura contendo 2,4-D

Os resultados para o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na indução de calos em diferentes explantes de *B. forficata* são apresentados na Figura 9. Concentrações de 2,4-D menores que 1,0 mg/L foram suficientes como indutoras de calos para todos os explantes. A indução foi dependente da concentração até 0,5 mg/L de 2,4-D para a maioria dos explantes testados. Em concentrações maiores, a formação de calos foi total e com características uniformes para todos os explantes (excepto embriões e folhas).

Figura 9. Efeito de 2,4-D na calogênese em diferentes explantes de *B. forficata* (A-Embrião; B-Segmento de raiz; C-Ápice radicular; D-Folha; E-Ápice caulinar; F-Segmento de entrenó; G-Segmento nodal). Os valores representam percentual de explantes que formaram calos (20 repetições, cada qual com 4 explantes) em 30 dias de cultura (ápices caulinares e segmentos de raízes em 75 dias).

Apenas em meios contendo até 0,25 mg/L de 2,4-D houve formação de raízes adventícias, sem a formação de parte aérea. Nos embriões e folhas foram induzidos calos em 75% dos explantes em meios com 0,50 e 1,0 mg/L, respectivamente. Devido à sua coloração escura de aspecto oxidado e pouco vigor em seu crescimento em termos de divisão celular, estes calos parecem pouco ativos. Em muitos calos, após tempo de cultivo, aleatoriamente formou-se com frequência estruturas brancas inertes sobre os mesmos.

Sob condições ainda não esclarecidas, houve proliferação de embriões somáticos em calos mantidos em meios com 2,5 mg/L de 2,4-D. Não foi possível ainda estabelecer quais as condições mais propícias. A embriogênese somática tem sido relatada estar associada a muitos fatores que podem ser cada qual determinante para o sucesso do processo de cultivo *in vitro*. A própria planta-matriz é fonte de muitos destes fatores, destacando-se o vigor, o estado nutricional, a sanidade, o estágio de desenvolvimento, relacionado com a época do ano nas espécies perenes e idade nas espécies anuais, e o genótipo (Ammirato, 1983; Read, 1990). Diferentes genótipos dentro da mesma espécie apresentam variação na capacidade potencial de embriogênese somática, como foi relatado em milho (Rapela, 1985/1986; Dolgykh, 1994, e Bohorova et al., 1995) e soja (Dhir et al., 1992, e Merkle et al., 1995). Nos trabalhos de cultivo *in vitro*, os fatores ambientais e nutricionais são muitas vezes negligenciados. Os fatores ambientais influenciam muito nas condições fisiológicas da planta-matriz e, conseqüentemente, do explante (Fitter & Hay, 1987). A cada colheita de sementes de *Bauhinia forficata* Link, foi observada variação do poder germinativo das sementes, afetando em muito a constância dos resultados. A variação no período de estiagem e/ou na intensidade de chuvas e as altas temperaturas são fatores que refletem o estado fisiológico das sementes (Fitter & Hay, 1987). A seleção das plantas-matrizes no campo é restrito a uma observação individual e superficial dentro de um grupamento em seu ambiente natural, desconsiderando a importância dos fatores do meio ambiente sobre a formação do explante (Tormala, 1990). Durante as coletas de sementes de *B. forficata* no campo, observou-se o aspecto da copa da árvore, da sua folhagem e das vagens e sementes, apenas descartando vagens e sementes danificadas ou deformadas. A indução de embriogênese somática em *B. forficata* aparentemente é dependente dos fatores ambientais e/ou do genótipo.

4.4.2 Indução de calos em meio de cultura contendo BAP

A maioria dos explantes formaram calos em meios contendo BAP em experimentos onde se objetivavam a micropropagação. Analisando apenas os calos formados, a indução foi intensa em concentrações tão baixas quanto 0,10 mg/L (Figura 10). A micropropagação só foi inibida em meio com concentrações de BAP maiores que 2,0 mg/L. Os explantes caulinares (segmentos nodais, de entre-nós e do hipocótilo) apresentaram maior frequência de formação de calos em concentrações baixas de BAP, mesmo ocorrendo simultaneamente micropropagação.

Figura nº 10. Efeito de BAP na indução de calogênese em diferentes explantes de *B. forficata* (A-Embriões; B-Segmento de raiz; C-Ápice radicular; D-Folha; E-Ápice caulinar; F-Segmento de entrenó; G-Segmento nodal). Os valores representam percentual de explantes que formaram calos (20 repetições, cada qual com 4 explantes) em 30 dias de cultura.

Os maiores calos, friáveis e de cor clara com tons esverdeados (Figura 11a), formaram-se em meios contendo 0,50 a 2,0 mg/L de BAP. Em meios sem fitorreguladores, ocorreu a indução de formação de calos friáveis pequenos com cor clara nos locais de corte, resultando numa camada periférica ativa em divisões celulares, podendo ser considerado uma resposta à injúria (Foskett & Roberts, 1965; Yeoman et al., 1968) ou exposição à luz (Yeoman & Davidsom, 1971). Os explantes terminais da parte aérea (ápices caulinares e folhas) formam calos friáveis (maiores que os calos acima descritos) de cor clara cobrindo o local do corte em concentrações baixas e médias. Os ápices radiculares e segmentos de raízes formaram calos apresentando camada fina de células de cor cinza escuro sobre o explante inicial. Em meios com altas concentrações de fitorregulador (acima de 5,0 mg/L), todos os explantes vegetativos da parte aérea formaram calos duros, esverdeados que se oxidavam com o tempo de cultura (Figura 11b). Muitos explantes apresentaram calos com características de mais de um dos tipos de calos acima descritos.

Em meios com altas concentrações de BAP, houve maior formação de calos em explantes de *B. forficata* e menor formação de brotações, ocorrendo inibição parcial da organogênese. A indução da calogênese ocorreu nas células mais externas do explante em contato com o meio de cultura. A formação das brotações sobre estes calos deve ser devido à uma diminuição do ritmo das divisões celulares na camada superficial (Yeoman et al., 1965) e às divisões e diferenciações que ocorrem nas camadas de células mais internas, onde surgem estruturas nodulares semelhantes a zonas meristemáticas que dão origem às brotações, em função da alteração na concentração de fitorreguladores ou metabólitos dentro do explante. Isto evidencia a existência de gradientes de metabólitos ou substâncias do próprio meio de cultura dentro do explante (Aitchison et al., 1977). Durante as repicagens, as brotações de *B. forficata* então formadas foram facilmente destacadas do calo, como se não tivesse nenhuma ligação com o explante inicial, caracterizando uma organogênese indireta. Isto foi demonstrado com cortes citológicos em culturas de *Sesbania grandiflora* (Detrez, 1994) e de tabaco (Floh & Handro, 1985).

(a)

(b)

Figura 11. Calos organogênicos formados em segmento de entrenó de *B. forficata* em meio contendo 2 mg/L de 6-BAP (a) e em ápice caulinar de *B. forficata* em meio com 4 mg/L de 6-BAP (b); (aumento = 20 X).

4.5 Manutenção de calos

Os calos induzidos por 2,4-D nos experimentos de calogênese foram mantidos em meios contendo 2,5 mg/L de 2,4-D, apresentando em sua maioria crescimento reduzido, com aspecto oxidado e necrótico. Durante as transferências, foi observado que diversos destes calos apresentavam crescimento com características embriogênicas (friáveis, de cor clara com partes esverdeadas, com aparência globular e início de formação de embrióides) (Figuras 12 e 13a).

Figura 12. Calo com células embriogênicas obtido a partir de segmento de hipocótilo de *B. forficata* inoculado em meio de cultura suplementado com 2,5 mg/L de 2,4-D (aumento = 20 X)

4.6 Embriogênese Somática

Nos calos que mostravam crescimento com características embriogênicas, foi observado desenvolvimento maior das partes globulares e diferenciação de estruturas semelhantes a embriões, denominados de embrióides (Figura 13a). Calos contendo estas estruturas foram transferidos para meios líquidos sem fitorreguladores e sob agitação mecânica, com o objetivo de se obter uma maior individualização dos embrióides e embriões somáticos, bem como o amadurecimento dos mesmos (Figura 13b).

Após uma semana sob agitação em meio líquido foi observada a desagregação dos calos, formando uma suspensão celular e agregados de calos rígidos, sendo estes últimos periodicamente removidos. Nos dias subseqüentes, foi observado o desenvolvimento de embriões somáticos individualizados com diferentes estágios de desenvolvimento e tamanhos, bem como o aparecimento de células embriogênicas, embrióides, embriões somáticos, embriões germinados e plântulas (Figura 13b).

A suspensão foi filtrada num sistema contendo 3 peneiras de malhas diferentes (aberturas de 0,15; 0,25 e 0,50 mm) e o material retido nas peneiras com poros maiores (embriões somáticos e embrióides individualizados) foi transferido para meios sólidos com e sem fitorreguladores para o desenvolvimento dos mesmos. Poucos embriões somáticos germinaram e a maioria apresentou-se com aspecto oxidado e, em muitos destes, houve crescimento de calos com aspecto embriogênico, indicando a ocorrência de embriogênese secundária. Em meios contendo fitorreguladores, poucos embriões se converteram em plantas completas e, ainda de forma aleatória, sem sugerir qualquer efeito dos fitorreguladores testados (ácido indolacético (IAA), cinetina (Kin) e ácido giberélico (GA_3)). Appezzato-da-Glória (comunicação pessoal) examinou microscopicamente cortes citológicos de embriões somáticos deste trabalho e considerou a formação destes embriões rudimentar e incompleta, considerando-os pouco capazes de se desenvolverem a plantas completas.

(a)

(b)

Figura 13. Morfogênese induzida por 2,4-D a $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ em *Bauhinia forficata* (a) calo de embrião zigótico contendo embrióides e embriões somáticos; (b) embriões somáticos formados em calos de ápices caulinares (aumento = 40 X).

5 CONCLUSÕES

1. A assepsia superficial utilizando hipoclorito de sódio a 0,5% não é suficiente para material vegetativo coletado em campo, exigindo-se um tratamento para o controle dos microorganismos endógenos.

2. A assepsia das sementes com o uso de hipoclorito de sódio a 1,5% por 30 minutos e de etanol a 70% por 3 minutos e a extração dos embriões zigóticos em câmara de inoculação asseptica é suficiente para a obtenção de embriões livres de microorganismos.

3. Os melhores resultados para a micropropagação foram obtidos utilizando como explantes embriões, segmentos nodais e de entrenó e ápices caulinares (em ordem decrescente) em meios contendo BAP.

4. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético mostrou-se eficiente na indução de calos na maioria dos explantes testados em concentrações superiores a 0,25 mg/L em 30 dias após a inoculação. As raízes exigiram mais tempo (75 dias) para a formação de calos.

5. A 6-benzilaminopurina na concentração de 0,5 mg/L mostrou-se eficiente na indução de calos na maioria dos explantes testados, principalmente segmentos nodais e de entrenó, o que não é usual ser relatado para as citocininas mas sim para as auxinas.

6. Regeneração a partir de células ocorreram quando os explantes foram inoculados tanto em presença de 2,5 mg/L de 2,4-D (embriogênese) como em presença de 2,0 mg/L de 6-BAP (organogênese). Embriões somáticos obtidos apresentaram baixa conversão em plantas.

7. As auxinas ácido indolbutírico (1,0 mg/L) e ácido naftalenoacético (5,0 mg/L) foram eficientes para o enraizamento das brotações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITCHISON, P.A; MacLEOD, A.J.; YEOMAN, M.M.; Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: STREET, H.E. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. 2 nd. Ed. Oxford: Blackwell Science Publishing Co., 1977. p.267-287.
- AMMIRATO,P.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, V. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**: techniques for propagation and breeding. v.1. New York: MacMilian Publishing Co., 1983. cap.3. p.82-123.
- BAJAJ,Y.P.S.; FURMANOWA,M.; OLSZOWSKA,O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. v.4. Berlin: Sringer-Verlag, 1988. p.60-103.
- BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A. Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. v.4. Berlin: Sringer-Verlag, 1988. p.3-36.
- BELTRATI, C.M.; PAOLI, A.A.S. Morfologia, anatomia e desenvolvimento das sementes e plântulas de *Bauhinia forficata* Link (*Leguminosae-Caesalpinioideae*). **Revista Brasileira de Biologia**, v.49 , n.2, p.583-590, 1989.

- BOHOROVA, N.E.; LUNA, B.; BRITO, R.M.; HUERTA, L.D.; HOISINGTON, D.A.
Regeneration potencial of tropical, subtropical, midaltitude and highland maize imbeds. **Maydica**, v.40 , n.3, p.275-281, 1995.
- COLLIN, H.A.; WATTS, M. Flavor production in culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, V. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. v.1. New York: MacMilian Publishing Co., 1983. cap.24. p.729-747.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. v.5. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Ministério da Agricultura, 1984. p.237.
- COSTA, O.A. Estudo farmacoquímico da unha-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link). **Revista da flora medicinal**, v.9, n.4, p.175-189, 1942.
- CRUZ, G.L. **Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil**. v.2. 1.ed. Belo Horizonte: Oficinas Gráficas Velloso, 1965.
- DETREZ, C.; NDIAYE, S.; DREYFUS, B. *In vitro* regeneration of the tropical multipurpose leguminous tree *Sesbania grandiflora* from cotyledon explants **Plant Cell Reports**,. v.14, n.1, p.87-93, 1994.
- DHIR, S.K.; DHIR, S.; WIDHOLM, J.M.. Regeneration of fertile plants from protoplasts of soybean (*Glycine max* L. Merr.): genotypic differences in culture response **Plant Cell Reports**,. v.11, n.5/6, p.285-289, 1992

- DOLGYKH, Y.I. Establishment of callus cultures and regeneration of maize plants. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. v.25: Maize. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p.24-36.
- FERRI, M.G. (Coord.) **Fisiologia vegetal**. v.2. 2.ed. São Paulo: E.P.U. 1975. 401p.
- FITTER, A.H.; HAY, R.M.K. **Environmental physiology of plants**. London: Academic Press Ltd, 1987.
- FLOH, E.I.S.; HANDRO, W. Variation of histological patterns in tobacco callus during successive subcultures. **Canadian Journal of Botany**, n.63, p.1794-1800, 1995.
- FOSKET, D.E.; ROBERTS, L.W. A histochemical study of callus initiation from carrot taproot phloem cultivated *in vitro* **American Journal of Botany**, n.52, p.929-937, 1965.
- GALLO, L.A.; CROCOMO, O.J. A cultura de tecidos em fitopatologia. In: BERGAMIN Fº, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. v.1. São Paulo: Ceres, 1995. p.494-506.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.
- GHARYAL, P.K.; MAHESHWARI, S.C. Differentiation in explants from mature leguminous trees. **Plant Cell Reports**, v.8, n.9, p.550-553, 1990
- GHARYAL, P.K.; MAHESHWARI, S.C. In vitro differentiation of plantlets from tissue cultures of *Albizia lebbek* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.2, n.1, p.49-53, 1982.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, 1990. p.99-169.
- HANDRO, W.; FLOH, E..S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, 1990. p.203-212.
- ILLG, R.D. Variação somaclonal. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, 1990. p.287-296.
- JACOBSEN, H.J. Biochemical mechanism of plant hormone activity. In: EVANS, D.A. et al.(ed.). **Handbook of Plant Cell Culture**. London:MacMilian Publishing Co, 1983. cap.3. p.82-123.
- JULIANI, C. Ação hypoglucemiante da “Unha de Vacca” (*Bauhinia forficata*). **Jornal dos Clínicos**. v.12, n.12, p.165-169, 1931.
- KAUL, V.; WILLIAMS, E.G. Multiple shoot induction *in vitro* from the hypocotyl of germinating embryos of flax (*Linum usitatissimum* L.). **Journal of Plant Physiology**, n.131, p.441-448, 1987.
- KLEIN, R.M. Ecologia da flora e vegetação do Vale do Itajaí. **Sellowa**, v.31, p.10-164, 1979.
- KUMAR, A. Micropropagation of a mature leguminous tree - *Bauhinia purpurea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.31, n.3, p.257-259, 1992.

- KUMAR, A.; TANDON, P.; SHARMA, A. Morphogenetic responses of cultured cell of cambial origin of mature tree - *Dalbergia sissoo* Roxb. **Plant Cell Reports**, v.9, n.12, p.703-706, 1991.
- MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; McKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344p.
- MATHUR, J.; MUKUNTHAKUMAR, S. Micropropagation of *Bauhinia variegata* and *Parkinsonia aculeata* from nodal explants of mature trees. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.28, n.1, p.119-121, 1992.
- MERKLE, S.A.; PARROTT, W.A.; FLINN, B.S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.). **In vitro somatic embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995, p.155-204.
- MIACHIR, J.I. Proposição de um protocolo de cultura de tecidos para produção de compostos secundários para *Curcuma zedoária* Roscoe. Piracicaba, 1992. Tese (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo. 125 p.
- MIYAKE, E.T.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. Caracterização farmacognóstica da pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, n.1, p.58-68, 1986.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

- PEREIRA, H. **Dicionário das plantas úteis do Estado de São Paulo**. São Paulo: Rothschild, 1929.
- RAHMAN, S.M.; HOSSAIN, M.; BISWAS, B.K.; JOARDER, O.I.; ISLAM, R. Micropropagation of *Caesalpinia pulcherrima* through nodal bud culture of mature trees. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, n.3, p.363-365, 1993.
- RAPELA, M.A. Mejoramiento del maiz: um sistema experimental modelo para cultivo de tejidos *in vitro*. **Revista de la facultad de agronomia – Univesidad de la Plata**, v.61/62, n.1/2, p.123-131, 1985/1986.
- READ, P.E. Environmental effects in micropropagation. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, V. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**: v.5 - ornamental species. New York: MacMillian Publishing Co., 1990. p.95-125.
- RITCHIE, G.^a; SHORT, K.C.; DAVEY, M.R. In vitro shoot regeneration from callus, leaf axils and petioles of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.40, n.211, p.277-283, 1989.
- RODRIGUES, R.R.; MATTHES, L.A.F.; TORRES, B.B. Espécies arbóreas: distribuição agregada ou reprodução assexuada? In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BOTÂNICA, 5., Havana. 1990. **Anales**. Havana, 1990. p.54
- SALATINO, A. Morfologia, anatomia e fitoquímica da folha de *Bauhinia holophila* (Bongard) Steudel. São Paulo, 1976. Tese (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

- SANTOS, E.M.G. Ecologia da polinização, fluxo do pólen e taxa de cruzamento em *Bauhinia forficata* Link. Piracicaba, 1994. 114p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SCHACHT, W.H.; LONG, J.N.; GOBENA, A. Aboveground biomass in coppicing woodland, northeas Brasil. **Forest Ecology and Management**, v.55, p.201-208, 1992.
- SCHULTHEIS, J.R.; CHÉE, R.P.; CANTLIFFE, D.J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, 1990, p.227-249.
- SUNDERLAND, N.; Nuclear cytology. In: STREET, H.E. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. 2 nd. Ed. Oxford: Blackwell Science Publishing Co., 1977. p.177-203.
- TARGON, M.L.N.; LEITE, A.; OTTOBONI, L.M.M.; MALACRIDA, S.A.; DA SILVA, M.; TURCINELL, S.R.; ARRUDA, P. Somaclonal variation, its possible origins and consequence. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M. (Eds.). **Biotechnologia para produção vegetal**. Piracicaba: CEBTEC/FEALQ, 1991, p.47-58.
- TOMAR, U.K.; GUPTA, S.C. Somatic embryogenesis and organogenesis in callus cultures of a tree legume - *Albizia richardiana* King. **Plant Cell Reports**, v.7, n.1, p.70-73, 1988.
- TORMALA, T.; OY, K. Genotype-phenotype interplay in micropropagation. In: NIJKAMP, H.J.J.; VAN DER PLAS, L.H.W.; VAN AARTRIJK, J.(eds) **Progress in plant celular and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990. P.102-107.

- TYLER, V.E. Medicinal plant reseach. 1953-1987. **Planta Médica**, v.54, n.2, p.95-100, 1988.
- UPRETI, J.; DHAR, U. Micropropagation of *Bauhinia vahlii* Wight & Arnott - leguminous liana **Plant Cell Reports**, v.16, n.1, p.250-254, 1996.
- YAMADA, Y.; FUJITA, Y. Production of useful compounds. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, V. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: v.1 - techniques for propagation and breeding**. New York: MacMilian Publishing Co., 1983. p.717-728.
- YEOMAN, M.M.; DAVIDSON, A.W. Effect of light on cell division in developing callus cultures. **Annual of Botany**, Oxford, n.35, p.1085-1100, 1971
- YEOMAN, M.M.; NAIK, G.G.; ROBERTSON, A.I. Growth and defferentiation of plant tissue cultures III. the iniation and pattern of cell division in developing callus cultures. **Annual of Botany**, Oxford, n.32, p.301-313, 1968
- WHITAKER, R.J.; HASHIMOTO, T. Production of secondary metabolites. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. (Ed.) **Handbook of plant cell culture: v.4 - techniques and applications**. New York: MacMillan, 1986. p.264-286.
- ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. **The plant cell**, v.5, p.1411-1423, 1993.

ANEXO

Tabela 1. Concentração de nutrientes do meio ½ MS (Murashige & Skoog, 1962) em mg/L.

Sais minerais	Concentração de sais (em mg/L)
NH ₄ NO ₃	825,000
KNO ₃	950,000
CaCl ₂ .H ₂ O	220,000
MgSO ₄ .7H ₂ O	185,000
K ₂ PO ₄	85,000
MnSO ₄ .4H ₂ O	11,150
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4,300
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,012
FeSO ₄ .7H ₂ O	13,900
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	18,650
HBO ₃	3,100
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,125
CoSO ₄ .6H ₂ O	0,012
KI	0,415
Vitaminas	Concentração de vitaminas (em mg/L)
Glicina	1,000
Ácido nicotínico	0,250
Pirimidina.HCl	0,250
Tiamina.HCl	0,050
Mio-inositol	100,000