

**PLANTAS ACLIMATIZADAS DE *Gomphrena macrocephala*
St.-Hil.: ASPECTOS ESTRUTURAIS, BIOQUÍMICOS
E DE CRESCIMENTO**

MÍRIAM FERRAZ MOREIRA

Engenheiro Agrônomo

Orientador: **Prof^ª. Dra. LILIAN B.P. ZAIDAN**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz" da 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

Junho - 1999

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

Moreira, Míriam Ferraz

Plantas aclimatizadas de *Gomphrena macrocephala* St.-Hil.: aspectos estruturais, bioquímicos e de crescimento / Míriam Ferraz Moreira. - - Piracicaba, 1999.
66 p. : il.

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

1. Anatomia vegetal 2. Carboidrato 3. Cerrado 4. Crescimento vegetal 5.
Enraizamento "in vitro" 6. Fotoperiodismo 7. Planta mediana 8. Planta nativa 9.
Propagação "in vitro" I. Título

CDD 633.883913

À meus pais,
Regina e Fábio
com muito orgulho

DEDICO

À Roselis do Amaral Ferraz (minha querida madrinha),
Dolores Camunhas Ferraz (minha querida comadre) e
Renata de Carvalho Kuerche (minha querida amiga), que
se foram durante a realização de minha Dissertação, mas
que eu faço questão de guardar para sempre, dentro do
meu coração.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Reconheço que meus agradecimentos são mais longos do que o habitual. Mas se eu fosse realmente ser justa, deveria colocar os nomes de todas as pessoas dos três Laboratórios que tive a oportunidade (e o prazer!!) de frequentar.

Os meus mais sinceros agradecimentos...

À Deus por ter me dado uma família maravilhosa, que amo tanto. Devo tudo, inclusive essa conquista, à minha mãe (Regina), meu pai (Fábio) e minhas queridas irmãs (Sílvia, Marília e Lavínia), que sempre estiveram ao meu lado, nos momentos alegres e difíceis. São, sem dúvida, os meus melhores amigos. Agradeço especialmente à Marília, por ter me auxiliado com o computador. Ao Filipe, meu sobrinho, que mesmo sem perceber, me ajudou com a sua alegria e carinho.

À Dra. Lilian B.P. Zaidan, por toda a sua paciência, por ter feito as pranchas da minha Dissertação, e pela dedicação com que fez as correções. Dizem que até o “jeito, e tre-jeito” dos orientadores são assimilados pelos orientados. Eu teria muito orgulho de que isso acontecesse comigo, porque a minha orientadora, é uma pessoa por quem tenho muito carinho e muita admiração.

À Dra. Cândida C.J. Vieira e Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória, que injustamente, não puderam ser oficialmente consideradas minhas co-orientadoras, em função das normas da ESALQ.

À minha amiga, Dra. Cândida C.J. Vieira, por ter me ensinado, com muita dedicação, tudo que eu sei sobre cultivo *in vitro*, frutanos e computadores. A sua ajuda e ensinamentos, foram indispensáveis desde o início até a finalização de meu trabalho.

À Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória, por ter sempre apresentado a mesma disponibilidade e dedicação que dispensa às suas (oficialmente) orientadas. Agradeço pelo seu entusiasmo contagiante. E por me mostrar que uma mulher pode se destacar profissionalmente, sem deixar que isso interfira na sua vida pessoal, no seu papel de mulher e de mãe.

Ao Dr. Otto Jesu Crocomo por ter me recebido com tanto carinho, e por ter me concedido o orgulho de me sentir como mais um membro do CEBETC, (ESALQ/USP), onde passei a maior parte do tempo de elaboração de minha Dissertação e onde tive toda a liberdade para usar reagentes e equipamentos.

À cada uma das pessoas, professores, funcionários e estagiários do CEBETC, pelo ambiente amistoso de trabalho.

Ao Dr. Luiz Antônio Gallo, pelas valiosas sugestões.

Ao MS Enio Tiago de Oliveira, exemplo de eficiência, por ter me ajudado sempre com muita disposição.

Ao Romeu Rocha, a pessoa mais serena que eu conheço, que muitas vezes me auxiliou.

Aos amigos, MS Márcia O. Mello Alves, Antônio Amaral, Fábio Borgatto e Dr. Murilo de Melo, por terem, tantas vezes, me apoiado e ajudado nas mais diversas situações.

Aos professores, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Botânica da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo, pelas palavras amigas e estimulantes.

À Dra. Beatriz Appezzato-da Glória pelo uso do Laboratório de Anatomia do Departamento de Botânica da ESALQ.

À Marli Kazue M. Soares por ter, pacientemente, me auxiliado em tudo que se refere ao preparo de lâminas, e por ter habilidosamente feito os cortes à mão livre.

À todos os pesquisadores da Seção de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo (IBt), pelo exemplo de dedicação, dignidade e ética.

Ao Dr. Edson Chu, pelas inúmeras vezes que, literalmente, me socorreu.

A Dra. Cecília T.T. Blatt pela dedicada amizade.

Às funcionárias, D. Helena Cirilo da Silva, D. Maria Amélia da Silva, Sirley Aparecida Cardoso, e Mary P. Monteiro do IBt, onde foram feitos os experimentos preliminares e toda a parte relacionada à fotoperiodismo e análises de carboidratos de minha Dissertação.

Aos estagiários e pós-graduandos do IBt, pela carinhosa amizade. Especialmente à pós-graduanda Josimara M. Rondon, por ter se responsabilizado pelas minhas plantas, na minha ausência.

Às indispensáveis secretárias Maria Solizete Granziol Silva (CEBTEC), Maria Aparecida C.A. Santos (IBt), Maria Cristina Clemente Furlan e Édina Maria Tornisiello Vitti (Depto de Botânica da ESALQ) pelas inúmeras vezes que me auxiliaram com grande disposição.

Ao colega Cesar de Castro, pela doação de terra do cerrado, utilizada na aclimatização.

À CAPES – Coordenadoria de Assistência à Pesquisa de Ensino Superior, pelo auxílio financeiro através da concessão de bolsa de Mestrado.

À amiga Clotilde Maria Batochio Cunha pela dedicada ajuda.

E por último, porém não menos importante, eu agradeço, com todo o meu amor, ao Esteban Roberto González, o meu namorado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	Viii
SUMMARY.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
	15
3. TÍTULO DO ARTIGO.....	
3.1. INTRODUÇÃO.....	17
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
4. TÍTULO DO ARTIGO.....	31
4.1. INTRODUÇÃO.....	32
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

**PLANTAS ACLIMATIZADAS DE *Gomphrena macrocephala*
St.-Hil.: ASPECTOS ESTRUTURAIS, BIOQUÍMICOS
E DE CRESCIMENTO**

Autora: MÍRIAM FERRAZ MOREIRA

Orientadora: Prof^ª. Dra. LILIAN B.P. Z Aidan

RESUMO

Gomphrena macrocephala St.-Hil (Amaranthaceae) é uma espécie herbácea perene nativa do cerrado brasileiro, que apresenta propriedades medicinais e potencial ornamental. Microestacas têm a aclimatização dependente do protocolo de enraizamento. Na presença de ácido indol butírico (IBA) no meio de enraizamento ocorre a formação de calos na base das microestacas e formação de raízes espessas e quebradiças. Na ausência de reguladores vegetais, no entanto, não há formação de calos e as raízes formadas são semelhantes às das plântulas. Somente as microestacas enraizadas sem fitorreguladores aclimatizam. O estudo anatômico foi feito com o intuito de relacionar a origem dos primórdios radiculares, e a estrutura das raízes adventícias formadas com a resposta ao processo de aclimatização. Verificou-se que, quando IBA é adicionado ao meio de cultura, ocorre uma frágil conexão vascular entre a parte aérea e o sistema radicular, as raízes adventícias mostram hipertrofia de células corticais e alterações no cilindro vascular. Por outro lado, as raízes adventícias formadas em meio sem reguladores de crescimento originaram-se a partir de células próximas ao periciclo, portanto com estreita relação com o sistema vascular. Estas raízes apresentaram estrutura anatômica normal. Estes resultados indicam que o

desempenho das funções das raízes pode estar comprometendo a aclimatização e, conseqüentemente o estabelecimento de novas plantas por períodos mais longos. A partição de carboidratos, conforme já relatado, é estreitamente relacionada com as fases fenológicas que *G. macrocephala* apresenta no seu ciclo de desenvolvimento. Depois de aclimatizadas em terra do cerrado, as plantas foram colocadas sob condições de fotoperíodo controlado (8, 12 e 16h) para verificar se esse fator ambiental pode interferir no crescimento, no comportamento fenológico e no acúmulo de frutanos nas raízes tuberosas dessas plantas. Verificou-se que dias curtos (8h) promoveram menor crescimento da parte aérea, características de senescência e acúmulo de polissacarídeos, semelhante ao observado para plantas em início de dormência. Dias longos, no entanto, estimularam maior desenvolvimento da parte aérea, e acúmulo de frutanos semelhante ao descrito para plantas em fase de crescimento vegetativo. O conhecimento do crescimento das plantas aclimatizadas sob condições fotoperiódicas controladas também trouxe informações importantes para a eventual produção de plantas em escala comercial. Considerando que o crescimento é favorecido por fotoperíodos de 12 h, que é a condição mais comumente encontrada no país ao longo do ano, a produção de plantas não acarretará ao produtor um gasto extra em termos de energia elétrica. Esta eventualmente poderá vir a ser necessária na etapa de indução floral. Foi possível demonstrar que plantas micropropagadas e aclimatizadas de *G. macrocephala* acumulam frutano do mesmo tipo que plantas crescendo no cerrado. Por isso, também podem ser usadas na indústria alimentícia como outras espécies do cerrado que acumulam frutano.

ACCLIMATIZED PLANTS OF *Gomphrena macrocephala* St.Hil.: STRUCTURAL, BIOCHEMISTRY AND GROWTH ASPECTS

Author: MÍRIAM FERRAZ MOREIRA

Adviser: Prof^a. Dra. LILIAN B.P. Z Aidan

SUMMARY

Gomphrena macrocephala St.-Hil. (Amaranthaceae) is a perennial herb native to the cerrado showing medicinal properties and that can also be used as an ornamental species. The plants can be micropropagated through nodal segments, and it was shown in the present study that the acclimatization process depends on the protocol used for rooting. When cultures were supplemented with indol-butiric acid (IBA), thick and easily broken roots and *callus* appear at the base of the microcuttings. When growth regulator is not added to the culture medium, no *callus* is formed and the adventitious roots are similar to seedlings roots. The anatomical study aimed to relate the origin of the root primordia and the anatomical structure of the adventitious roots to the results obtained during the acclimatization process. In the presence of IBA in the culture medium a fragile vascular connection between roots and shoots was observed. Abnormal adventitious roots showing alteration in the vascular cylinder and hypertrophy of the cortical cells were also noticed. These results show that the roots play an important role in the acclimatization process and thus in the establishment of the new plants. As with other plants of the cerrado *G.macrocephala* is characterized by well defined fenological phases. *G.macrocephala* has been studied because of its particular fructan acumulation in the tuberous roots, the variation of these carbohydrates being related with

phenological phases. Micropropagated and acclimatized plants were used to investigate the presence of fructans in tuberous roots and to verify if the photoperiodic conditions interfere on growth, phenological behavior and on fructan accumulation. Short days (8h) provide lower shoot growth, and induce the appearance of senescence characteristics and accumulation of polysaccharides, as already reported to plants in early dormancy. Long days (12h and 16h), however, increased shoot growth and resulted in lower fructan contents, similar to what is observed in the vegetative growth phase of this plant. The knowledge of how acclimatized plants grow under controlled photoperiodic conditions is important because it makes possible their eventual commercial production. Considering that the growth is favoured with 12h photoperiod, that is in the normal daylength in most of the country, plant production can be done without extra electric energy expense. This could be necessary eventually only to the flower induction. It was possible to demonstrate that micropropagated and acclimatized plants of *G.macrocephala* accumulate fructans of the same type of plants growing in the cerrado. Thus they can also be used in the food industry, likewise other cerrado species that accumulate fructans.

1. INTRODUÇÃO

Gomphrena macrocephala (Amaranthaceae) é uma espécie herbácea perene que apresenta propriedades biológicas e medicinais (Yamamoto & Mino, 1995), além de ter potencial ornamental. Esta espécie vem sendo extensivamente coletada de regiões de cerrado e campos rupestres, onde cresce naturalmente, o que tem provocado uma redução significativa das plantas em seu habitat natural. São plantas difíceis de propagar em decorrência do reduzido número de sementes viáveis que apresenta, e do longo período requerido para propagação vegetativa, que se dá a partir de brotações de gemas localizadas no órgão subterrâneo.

Na medicina popular, tem sido empregada contra diarreia, febre e doenças pulmonares, como analgésico e tonificante. Foi constatada nesta espécie a presença de metabólitos secundários como ecdisterona, saponinas, e frutopolissacarídeos (Vieira e Figueiredo-Ribeiro, 1993; Figueiredo-Ribeiro et al., 1986) identificados como sendo frutanos do tipo fleano (Vieira & Figueiredo-Ribeiro et al., 1993; Yamamoto et al., 1996). Este fato faz de *G. macrocephala* a única da subordem Cariophyllidae, até o presente, a apresentar acúmulo desse tipo de carboidrato.

O potencial ornamental de *G. macrocephala* está relacionado com a presença de uma inflorescência na forma de capítulo, de tamanho relativamente grande e coloração púrpura o que, contrastando com o verde pálido de suas folhas, a faz muito bela. É necessário, no entanto, que exista um maior domínio do processo de produção de plantas em larga escala, bem como

da sua floração, para que esta espécie possa ser usada comercialmente, seja na indústria farmacêutica ou de alimentos, seja como espécie ornamental.

G. macrocephala, assim como muitas outras espécies herbáceas perenes de cerrado, apresenta fases fenológicas bem definidas: no outono, a parte aérea senesce, no inverno permanece dormente, na primavera ocorre uma rápida brotação e, no verão, floresce (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993). Existe uma estreita relação entre a fenologia apresentada por *G. macrocephala* e o padrão de acúmulo de carboidratos no órgão subterrâneo: nas fases de brotação, assim como na fase vegetativa, ocorre um aumento de oligossacarídeos e de polissacarídeos de baixo peso molecular, enquanto na fase reprodutiva e no início da dormência há um aumento de polissacarídeos de alto peso molecular e uma diminuição do teor de oligossacarídeos (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993).

O comportamento fenológico de *G. macrocephala* pode estar relacionado com as variações fotoperiódicas. Coutinho (1977) relaciona os fotoperíodos mais curtos do outono e inverno no cerrado, às temperaturas mais baixas que ocorrem neste período e que possivelmente contribuem para a redução da produção de matéria seca nas plantas desse bioma.

Tendo em vista que o acúmulo de frutanos em órgãos perenes, tais como tubérculos e raízes tuberosas, pode ser afetado por fatores externos e por processos de desenvolvimento que alteram a partição de compostos de reserva (Pollock, 1986; Figueiredo-Ribeiro, 1993), o presente estudo procurou verificar o efeito do fotoperíodo no crescimento e na indução floral, além de tentar estabelecer uma possível relação entre esses processos e o padrão de acúmulo de carboidratos. Sabendo-se o crescente interesse em frutanos, por exemplo na fabricação de xaropes e na prevenção de cáries dentárias (Hendry, 1993), seria muito oportuno monitorar a presença deste carboidrato através do controle dos fatores que induzem sua produção.

A micropropagação tem sido uma boa opção para a multiplicação de *G. macrocephala* (Mercier et al., 1992). Foi possível, segundo o protocolo apresentado por Mercier et al. (1992) para micropropagação desta espécie, reproduzir as etapas de multiplicação e enraizamento de brotações axilares em condições *in vitro*. Na etapa de aclimatização, no entanto, não foi obtido sucesso, tornando-se necessária a realização de vários estudos e tentativas deste procedimento para a obtenção de plantas que sobrevivessem em condições *extra vitrum* por um período suficiente para a realização dos estudos de crescimento e desenvolvimento.

O insucesso na aclimatização pode estar relacionado com diversas variáveis, desde condições inadequadas de umidade relativa do ambiente e do substrato, ou seja, fatores do meio externo, até fatores internos à planta, como má formação do sistema radicular. Deste modo, o processo de aclimatização mereceu um estudo mais aprofundado. Depois de muitas tentativas envolvendo os vários aspectos que influenciam essa etapa, foi realizado o enraizamento em meio de cultura desprovido de regulador vegetal, considerado inviável até então (Mercier et al., 1992), mas que foi possível nas condições testadas no presente trabalho. Neste caso, as raízes adventícias formadas na base das microestacas possibilitaram aclimatização adequada. Para elucidar a razão pela qual microestacas enraizadas com IBA (ácido indol butírico) não aclimatizavam, enquanto microestacas enraizadas na ausência de substâncias auxínicas sobreviviam com sucesso por períodos mais longos, foi feito um estudo histológico na base das microestacas em processo de enraizamento. Este estudo possibilitou relacionar a origem e a anatomia das raízes adventícias formadas ao sucesso da aclimatização.

Plantas naturalmente propagadas (por germinação de sementes ou através de brotações provenientes da raiz tuberosa) acumulam frutanos do tipo fleano (Shiomi et al., 1996; Vieira, 1996). As raízes adventícias de plantas

micropropagadas acumulam frutanos exclusivamente do tipo inulina (Vieira, 1996). No presente trabalho, procurou-se estudar os carboidratos acumulados nas raízes das plantas micropropagadas, porém já aclimatizadas, visando conhecer o tipo de frutano acumulado, a fim de elucidar o padrão de carboidrato que é acumulado por essas plantas.

A partir do estabelecimento das condições adequadas para a obtenção de plantas devidamente aclimatizadas, foi então acompanhado o crescimento vegetativo e observada a floração sob condições fotoperiódicas controladas. Os dados obtidos forneceram informações básicas importantes para o emprego futuro da espécie para fins comerciais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Gomphrena* (Amaranthaceae) compreende 120 espécies, das quais 25% são endêmicas da Austrália, sendo as restantes nativas da América do Sul, América Central e sul dos Estados Unidos (Palmer, 1998). Estima-se em 40 o número de espécies nativas do Brasil encontradas preferencialmente em áreas de cerrado, campo limpo, campo rupestre, caatinga, e poucas em matas (Vieira, 1994). *Gomphrena macrocephala* é a espécie amplamente distribuída, ocorrendo naturalmente no cerrado brasileiro, desde o nordeste até o sul do país (Siqueira, 1985). Trata-se de uma espécie herbácea perene, com propriedades biológicas e medicinais (Yamamoto et al., 1996) já conhecidas desde o século IX (Vieira, 1991). *G. macrocephala*, assim como muitas outras espécies nativas do cerrado, vem desaparecendo, uma vez que o cerrado é o ecossistema com maior velocidade de devastação do Brasil, depois da mata atlântica. O cerrado brasileiro ocorre de forma descontínua desde 4° de latitude norte até 24° de latitude sul e entre 42° até 65° de longitude oeste (Ranzani, 1971). Apesar de constituir-se na segunda maior formação vegetal brasileira, depois da Floresta Amazônica, os cerrados não foram incluídos entre os grandes biomas protegidos pela Constituição Brasileira. Esta formação fica, portanto, extremamente fragilizada frente à legislação, uma vez que é protegida apenas pelo Código Florestal (Secretaria do Meio Ambiente, 1997).

Os cerrados podem ser definidos do ponto de vista ecológico como uma formação aberta tropical dominada fisionomicamente por graminóides cespitosos, sob clima tropical, onde seca e incêndios (naturais ou provocados)

ocorrem periodicamente (Coutinho et al., 1982). Este conceito é falho no que diz respeito ao cerrado onde, embora a vegetação apresente as mesmas características, existe sobreposição de copas. Do ponto de vista climático, pode ser observada com nitidez uma estação chuvosa, que coincide com os meses mais quentes do ano, concentrando-se nesta época de 80% a 90% da precipitação anual, o que favorece a lixiviação e conduz ao oligotrofismo; e uma estação seca, quando há mortalidade da parte aérea, principalmente de espécies do estrato herbáceo, o que gera acúmulo de matéria orgânica na superfície do solo, favorecendo a incidência de incêndios. A temperatura não exerce, como a precipitação, uma atuação marcante na região dos cerrados, sendo relativamente pequena oscilação térmica média durante o ano (Chaves & Naves, 1998).

Existe grande variação de solos sob cerrado do ponto de vista morfológico e físico (Rizzini, 1971). Estes solos possuem como características comuns o fato de serem distróficos, deficientes em fósforo, cálcio, magnésio e zinco, e de apresentarem problemas de toxidez causados principalmente por alumínio e manganês. Em resposta às condições do solo, a vegetação se apresenta predominantemente com baixo porte e tortuosidade na parte aérea provida de córtex espesso e folhas grandes, sendo por isso caracterizada como escleromórfica. No entanto, estas características não são exclusivamente provocadas pelas características do solo.

Coutinho et al. (1982) comenta que entre as particularidades ecológicas da vegetação do cerrado encontram-se sistemas de sobrevivência às queimadas estacionais. Algumas plantas do cerrado podem apresentar características anatômicas e morfológicas tais como a presença de gemas protegidas através de bainhas bem desenvolvidas, xilopódios e raízes tuberosas. Com relação ao estresse hídrico, algumas plantas, principalmente do estrato herbáceo, apresentam controle estomático bem aprimorado. Existem

“mecanismo de defesa” também contra estresses causados por herbivoria, que é amenizada pela presença de compostos secundários como óleos, fenóis, látex e resinas ou pela presença de folhas coriáceas e/ou pilosas. É usual em espécies nativas do cerrado a presença de nectários extraflorais que favorecem a associação com formigas agressivas.

O comportamento fenológico da vegetação do cerrado, segundo Mantovani & Martins (1988), parece representar uma série de estratégias adaptativas para superar estresses térmicos, hídricos e nutricionais, podendo favorecer a ação de agentes polinizadores e dispersores. São consideradas adaptações à menor disponibilidade de água a abscisão foliar, morte de ramos e de indivíduos de espécies anuais, brotações no período das chuvas e dormência durante o outono e inverno (Coutinho et al., 1982; Mantovani & Martins, 1988). Os fotoperíodos mais curtos do outono e inverno e as baixas temperaturas que freqüentemente ocorrem durante esta época do ano talvez contribuam para a redução de produção de matéria seca. Assim, a aparência senescente, amarelada e improdutiva das porções epigéias das plantas do estrato herbáceo-arbustivo durante o inverno não é obrigatoriamente decorrente da deficiência hídrica, podendo os outros fatores ambientais citados também induzir as mesmas características fenológicas (Coutinho et al., 1982).

As espécies herbáceo-subarbusivas florescem geralmente após um período de acúmulo de carboidratos e produzem frutos na maioria secos, anemorcóricos e autocóricos, favoráveis à dispersão (Mantovani & Martins, 1988). O pico da fase reprodutiva entre as espécies estudadas por esses autores foi no verão, sendo observada a ocorrência de floração a partir de novembro, quando são registradas as temperaturas médias mais altas, maior precipitação e umidade relativa do ar, o fotoperíodo mais longo e o aumento no número de polinizadores. Apesar da sincronização da floração das espécies

observadas, existe na vegetação do cerrado predominância de reprodução vegetativa (Labouriau, 1971; Rizzini, 1976).

A sobrevivência do componente herbáceo no inverno depende de nutrientes minerais e orgânicos, principalmente carboidratos armazenados em grande quantidade nos órgãos subterrâneos, antes da queda das folhas (Dietrich & Figueiredo-Ribeiro, 1985; Figueiredo-Ribeiro et al. 1986; Carvalho et al., 1997) *G. macrocephala* acumula frutanos, que consistem basicamente em séries homólogas de oligo e polissacarídeos não redutores contendo resíduos de frutose ligados a uma molécula de sacarose (Edelman & Jefford, 1968; Figueiredo-Ribeiro et al., 1991). Estes compostos podem ser distinguidos de outros polissacarídeos por apresentarem algumas propriedades, como: levorrotatoriedade, alta solubilidade em água, suscetibilidade à hidrólise ácida e serem exclusivamente armazenados nos vacúolos, podendo atingir acima de 70% da matéria seca de órgãos subterrâneos de reserva (Pollock & Chatterton, 1988; Figueiredo-Ribeiro et al., 1991). As condições de alta irradiação do cerrado favorecem uma alta taxa de fotossíntese, podendo favorecer o armazenamento de compostos de reserva, tendo em vista que o cerrado é um ecossistema com limitações decorrentes do oligotrofismo de seus solos e da periodicidade pluviométrica (Delitti, 1990; Figueiredo-Ribeiro et al., 1991).

O crescimento vegetal é decorrente de divisões celulares e/ou aumento no tamanho das células. Quando o crescimento se dá preferencialmente por aumento no tamanho das células, observa-se grande concentração de frutanos no vacúolo das células que estão em processo de expansão. O controle do potencial osmótico, assim como o rápido suprimento de energia, se dá através de polimerização e despolimerização destes frutanos (Hendry, 1987). Publicações mais recentes sugerem que a função natural dos frutanos em angiospermas, na sua origem e evolução, está menos relacionada com tolerância à baixa temperatura, como suponha-se anteriormente, e mais com a

regulação da absorção e retenção de água, e com o crescimento provocado por expansão celular, na maioria dos ecossistemas fora dos extremos de regiões tropicais e polares (Hendry, 1993).

É comum na região do cerrado no estado de São Paulo, onde cresce *G. macrocephala*, um período de seca de até quatro meses de duração (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993). O fogo parece ser benéfico para *G. macrocephala* na dispersão de suas sementes anemocóricas, que é favorecida quando a superfície do solo está livre de galhos secos que poderiam interferir na ação dispersiva do vento (Coutinho, 1977; Vieira et al., 1994).

Plantas de *G. macrocephala* em condições naturais apresentam manchas de coloração púrpura em folhas e hastes, particularmente no final do período reprodutivo e no início do período de dormência, que coincidem com o início do outono (Vieira, 1991; Vieira et al., 1994); a presença de betalaína, segundo alguns autores citados por Vieira et al. (1994), pode significar uma adaptação da planta para sobrevivência em condições severas de deficiência hídrica.

G. macrocephala apresenta fases fenológicas bem definidas: no outono, a parte aérea morre; durante o inverno, ocorre dormência do sistema subterrâneo; na primavera, há uma rápida brotação e no verão a planta floresce (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993). O órgão subterrâneo de reserva de *G. macrocephala* contribui para a reprodução vegetativa, seja pela sua grande capacidade de brotação, seja através de estacas radiculares, como é feito rotineiramente no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo (Vieira et al., 1994). Esta estrutura pode atingir profundidades de até 1,5m, podendo com isso efetuar a absorção de água em períodos em que esta é escassa nos horizontes mais superficiais do solo.

Pertencente à Subordem Caryophyllidae, *G. macrocephala* foi a única espécie, até o presente, em que foi constatada a presença de frutanos, chegando este carboidrato a constituir 50% da matéria seca do órgão

subterrâneo. Vieira (1991) observou alterações no padrão de acúmulo de carboidratos, conforme ocorriam mudanças nas fases fenológicas. No final do período de dormência, há um aumento no teor de oligossacarídeos, principalmente monossacarídeos do tipo frutose, concomitantemente à redução no teor de polissacarídeos (frutanos), provavelmente em decorrência da hidrólise deste composto. Na fase de brotação, assim como na fase vegetativa, foi observado aumento de oligossacarídeos e de polissacarídeos de baixo peso molecular. Na fase reprodutiva, no entanto, constatou-se aumento no peso molecular de polissacarídeos e redução no teor de oligossacarídeos.

A capacidade de acumular frutano (Figueiredo-Ribeiro et al., 1986; Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993), ao invés de amido, parece ser uma estratégia de sobrevivência às condições adversas do cerrado, tendo em vista que os frutanos são açúcares prontamente disponíveis (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993; Vieira et al., 1994). As variações sazonais encontradas, tanto nos níveis como na composição dos frutanos nessa espécie, sugerem que estes polímeros possam ter outras funções além de constituírem a principal reserva energética nas espécies que os acumulam. Sua localização nas proximidades dos tecidos vasculares condutores de água, seu metabolismo rápido em comparação a outros compostos de reserva e sua ampla ocorrência em plantas adaptadas a ambientes com restrição hídrica temporária reforçam a teoria de que os frutanos estejam relacionados com processos de osmorregulação (Figueiredo-Ribeiro, 1993).

Os carboidratos armazenados no órgão subterrâneo de *G. macrocephala* foram caracterizados como sendo frutanos do tipo fleano (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993; Shiomi et al., 1996). Os oligossacarídeos dessa espécie, analisados por cromatografia delgada, formam uma série homóloga aparentemente única, cujo padrão de distribuição dos membros é diferente da série inulina (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993). Além do acúmulo de açúcares,

foi também constatado o acúmulo de grande quantidade de zinco em raízes tuberosas de *G. macrocephala*, o que confirma a teoria de Coutinho et al. (1982) na qual os órgãos subterrâneos de espécies do cerrado seriam mais significativos no acúmulo de nutrientes minerais do que como reservatório de água (Vieira, 1991).

Hoehne (1939) considerou haver grande semelhança entre *G. macrocephala* St.-Hil. e *G. officinalis* Mart. Ambas são definidas como “remédio universal” e apresentam os mesmos nomes vulgares: “paratudinho”, “paratudo” (esta designação é coincidente com a de outras espécies que apresentam propriedades medicinais, segundo Hoehne, 1939), “paratudo-do-campo” ou “erva-do-padre-Salerma” (Vieira, 1991). A semelhança entre as duas espécies é muito grande: ambas apresentam sistema subterrâneo desenvolvido semelhante a uma raiz tuberosa, o qual não foi ainda definido do ponto de vista anatômico (Vieira, 1991). Esta estrutura foi anteriormente considerada como xilopódio (Hoehne, 1939) e como caule tuberoso (Dietrich & Figueiredo-Ribeiro, 1985), mas atualmente tem sido reconhecida como uma raiz tuberosa (Yamamoto & Mino, 1995, Young et al., 1997). Observações preliminares sobre a anatomia desse órgão mostraram a ocorrência de câmbios supernumerários, dispostos de forma anelar e concêntrica (Vieira, 1991). Trata-se de uma estrutura lignificada da qual anualmente provém a parte aérea, que é constituída por brotações portando três a quatro pares de folhas opostas, elíptico-lanceoladas, fortemente revestidas por pêlos longos e amarelados, numa haste que termina com o capítulo floral (Hoehne, 1939). As duas espécies diferem com relação à coloração das brácteas, que são púrpuras em *G. macrocephala* e amarelo-alaranjado em *G. officinalis*.

A semelhança entre as duas espécies fez com que Siqueira se referisse a *G. macrocephala* como sendo *G. officinalis* (Siqueira, 1985). O mesmo aconteceu em publicações de alguns outros autores (Vieira, 1991; Young et al., 1992; Mercier et al., 1992), até que em uma revisão do gênero *Gomphrena*, Siqueira (1991) reconsiderou seu ponto de vista e reconheceu

a espécie estudada como *G. macrocephala* St.-Hil. (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993).

Entre as espécies brasileiras do gênero *Gomphrena*, *G. pohlii* Moq., *G. arborescens* L.f, *G. vaga* Mart., *G. mollis* Mart., *G. leucocephala* Mart., *G. globosa* e *G. nmacrocephala* St.-Hil são as mais importantes do ponto de vista medicinal, sendo estas empregadas como analgésico, tônico, carminativo e no tratamento de diarreia, febre e doenças pulmonares (Siqueira, 1985, 1987, 1991; Vieira et al., 1994). A infusão de folhas de *G. macrocephala* é utilizada contra dismenorréia, enquanto a de sua raiz tuberosa é empregada como tônico, estimulante, e febrífugo (Siqueira, 1987, Vieira et al., 1994). *G. macrocephala*, além de suas propriedades medicinais, apresenta significativo potencial ornamental, em decorrência da belíssima inflorescência, com longas brácteas de coloração púrpura que contrastam com a pálida coloração verde de suas folhas. Sua inflorescência tem longa duração, assim como a de *G. globosa*, espécie já empregada como ornamental e que, em função dessa característica apresentada por sua inflorescência, recebeu o nome popular de “sempreviva”.

O interesse por *G. macrocephala* também baseia-se nos metabólicos secundários que esta espécie sintetiza. Plantas no período reprodutivo apresentam até 4% da matéria seca do órgão subterrâneo de ecdisterona, o que é considerado um valor elevado. Fitoecdisteronas atuam com esterilizantes químicos que agem contra insetos (Vieira et al. 1994). Hoehne (1939), relatou a presença de saponinas nesta espécie. Este autor confere à saponina ação pronunciada contra vermes intestinais, sendo utilizada contra hemorróides e moléstias pulmonares. Uma saponina triterpenoidal (“chikusetsusaponina IVa”), composta por ácido oleanólico, glucose e ácido glucorônico, tem sido isolada a partir da raiz tuberosa desta espécie (Young et al., 1992). Existe uma

considerável variação sazonal no acúmulo de saponinas na raiz tuberosa de *G.macrocephala*, sendo que no período vegetativo limita-se a 4% da matéria seca, enquanto no período de dormência pode chegar a 20%. Saponinas são eficientes contra vetores de muitas doenças parasíticas. As saponinas triterpenoidais exibem potencial para o controle de níveis de colesterol (Vieira et al., 1994). Em Yamamoto & Mino (1995) está descrita uma significativa atividade moluscicida do extrato de raízes tuberosas de *G.macrocephala* em lesmas adultas de *Biomphalaria glabrata*. Tanto o extrato aquoso como o etanólico causaram taxa de mortalidade de 90% em lesmas adultas, podendo este efeito ser explicado pela presença de saponinas (Young et al., 1992). Misturas de triterpenóides glucosídicos a partir de extratos em acetato de etila de *G.macrocephala* que também apresentam atividade moluscicida foram identificadas através de ressonância nuclear magnética com ^{13}C (Young et al., 1997).

Embora sementes de *G.macrocephala* apresentem cerca de 80% de germinação, essa espécie aparentemente produz um número reduzido de sementes viáveis, apesar do grande número de flores reunidas em inflorescências capituliformes (Vieira, 1991). A propagação vegetativa é limitada em função do longo período necessário para o desenvolvimento de raízes tuberosas. Estes problemas restringem a multiplicação da espécie em larga escala. A cultura de tecidos tem sido investigada como uma alternativa para a propagação rápida da espécie reduzindo, portanto, o risco de extinção (Mercier et al., 1992). O cultivo *in vitro* também possibilita um sistema adequado de produção de compostos de interesse econômico. Vieira et al. (1994) relataram a presença de carboidratos contendo frutose em explantes foliares e nodais, em calos (embora em menor quantidade que em raízes tuberosas), e em plantas intactas. A presença de betalaína, bem como de saponinas e ecdisteronas também foi observada em calos de *G. macrocephala*.

O número de espécies nativas tropicais e subtropicais ainda inexploradas e que apresentam grande potencial de utilização é extremamente grande, comparando-se com as poucas espécies cultivadas com interesse econômico (N.A.S., 1978). Em parte, esta situação é decorrência da falta de informações a respeito da fisiologia e bioquímica de espécies nativas (Labouriau, 1971; Figueiredo-Ribeiro et al. 1986). *Gomphrena macrocephala* é uma das muitas espécies nativas brasileiras com potencial de utilização múltipla, tendo para isso que ser amplamente estudada. São interessantes estudos relativos ao aprimoramento de métodos de propagação, bem como ao efeito do fotoperíodo, tendo em vista as alterações sazonais na produção de compostos secundários e no acúmulo diferencial de carboidratos que esta espécie apresenta.

3. ESTUDOS ANATÔMICOS DO EFEITO DE IBA NO ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE *Gomphrena macrocephala* St.-Hil.

RESUMO

Gomphrena macrocephala St.-Hil. (Amaranthaceae) é uma espécie herbácea perene nativa do cerrado brasileiro que vem sendo explorada pelas suas propriedades farmacológicas e ornamentais. Esta espécie pode ser micropropagada através de segmentos nodais, no presente estudo verificou-se que o processo de aclimatização depende do protocolo utilizado no enraizamento das microestacas. Na presença de ácido indolacético (IBA), a base das microestacas formam calo e raízes adventícias espessas e quebradiças dificultando a transferência destas para as condições *extra vitrum*. Por outro lado, na ausência de fitorreguladores as microestacas não formam calo e as raízes adventícias são morfológicamente similares as de plantas obtidas de sementes e o processo de aclimatização é bem sucedido. O estudo anatômico visou relacionar a origem dos primórdios radiculares e a estrutura anatômica das raízes adventícias com as diferentes respostas ao processo de aclimatização. Foi observado que na presença de IBA ocorre uma frágil conexão vascular entre o sistema radicular e a microestaca e a presença de raízes adventícias mal formadas, com alterações no cilindro vascular e hipertrofia das células corticais. Esses resultados indicam que o desempenho das funções das raízes pode estar prejudicado comprometendo a aclimatização e o estabelecimento das novas plantas por períodos mais longos.

Palavras-chave: *Gomphrena*, anatomia, enraizamento *in vitro*, IBA.

**ANATOMICAL STUDIES OF THE IBA EFFECT ON *in vitro* ROOTING
OF *Gomphrena macrocephala* St.-Hil.**

ABSTRACT

Gomphrena macrocephala St.-Hil. (Amaranthaceae) is a perennial herb native to the cerrado showing medicinal properties and that can be used as an ornamental species. The plants can be micropropagated through nodal segments, and in the present study it was shown that the acclimatization process depends on the protocol used for rooting. When cultures were supplemented with indol-butyruc acid (IBA), thick and easily broken roots and callus appear at the base of the microcuttings. These roots cause problems in the transfer to *extra vitrum* conditions. By the other hand, when no growth regulator is used, no *callus* is formed, the adventitious roots are similar to those found in seedlings, and acclimatization can proceed. The anatomical study aimed to relate the origin of the roots primordia and the anatomical structure of the adventitious roots to the results obtained during acclimatization. In the presence of IBA a fragile vascular connection between roots and shoots was observed. Abnormal adventitious roots showing alteration in the vascular cylinder and hypertrophy of the cortical cells were also noticed. These results point to the roots play an important role in the acclimatization process and thus in the establishment of the new plants.

Key Words: *Gomphrena*, anatomy, *in vitro* rooting, IBA.

3.1. INTRODUÇÃO

Gomphrena macrocephala St.-Hil. (Amaranthaceae) ocorre no Brasil, em vegetação de cerrado, campo rupestre e caatinga (Vieira, 1991). Trata-se de uma herbácea perene, provida de raiz tuberosa, muito utilizada na medicina popular. A infusão de folhas é usada contra dismenorréia, enquanto a infusão da raiz tuberosa fresca é empregada como um tônico, estimulante e febrífugo (Vieira et al., 1994; Siqueira, 1997). Figueiredo-Ribeiro et al. (1986) observaram que, além da importância econômica dos órgãos de reserva de muitas espécies do cerrado para a indústria alimentícia e farmacológica, deve-se ressaltar o papel dos carboidratos na fisiologia destas plantas e na sua adaptação ecológica ao ambiente do cerrado. Essa última poderia estar relacionada à disponibilidade de reserva para o processo de organogênese (Apezzato-da-Glória & Estelita, 1995).

O interesse na espécie tem acelerado o seu desaparecimento. Em condições naturais, as plantas requerem um longo período para desenvolver o órgão subterrâneo. A propagação sexuada, bem como a vegetativa, apresenta dificuldades que restringem sua multiplicação em larga escala (Mercier et al., 1992). A propagação vegetativa através da formação de gemas em fragmentos radiculares vem sendo registrada para várias espécies adaptadas às condições de cerrado (Rizzini & Heringer, 1966). Porém, são poucas as análises anatômicas que permitem o esclarecimento dos prováveis sítios de formação destes órgãos adventícios. Tais informações poderão ser úteis na compreensão dos mecanismos de adaptação destas plantas às condições de cerrado (Apezzato-da-Glória & Estelita, 1995).

Mercier et al. (1992) mencionaram que microestacas de *G. macrocephala* enraizavam somente na presença de substâncias auxínicas, como ácido naftaleno acético (NAA) ou ácido indol butírico (IBA), no meio de

cultura, à semelhança de muitas espécies (Hartmann et al., 1990). Com *G. macrocephala*, Mercier et al. (1992) não tiveram sucesso no enraizamento de microestacas quando utilizaram o meio básico M.S. (Murashige & Skoog, 1962) desprovido de reguladores de crescimento, ou quando suplementado com ácido indolacético (AIA). Seguindo o protocolo de Mercier et al. (1992), foram propagadas e enraizadas microestacas de *G. macrocephala in vitro*, em meio MS, na ausência de qualquer substância auxínica, e tendo-se observado que estas foram as únicas microestacas que conseguiram sobreviver ao processo de aclimatização por períodos acima de três meses.

A formação de raízes adventícias pode ser considerada como uma seqüência de vários processos, do ponto de vista bioquímico (Gaspar, 1981) e histológico (Lovell & White, 1986). Esses processos também podem ser identificados fisiologicamente por mudanças provocadas em resposta à adição de reguladores de crescimento. As mudanças que ocorrem na formação de raízes adventícias são bem conhecidas: auxina é requerida na primeira fase de formação da raiz, mas bloqueia o crescimento e o desenvolvimento do primórdio radicular, ao passo que a inibição do enraizamento por citocininas ocorre especificamente nos primeiros estágios do processo de enraizamento (De Klerk et al., 1995).

A formação de raiz adventícia é um evento multicelular complexo, freqüentemente envolvendo reativação de divisão celular de células não diretamente relacionadas com a formação de meristemóides (Altamura, 1996). Foram identificados dois padrões de formação de raiz adventícia tanto em espécies herbáceas como em arbóreas. Um deles consiste no desenvolvimento direto do primórdio radicular a partir de células associadas ou próximas ao sistema vascular. O outro padrão é definido por um processo indireto, no qual a formação da raiz adventícia é precedida por uma proliferação de células originando um calo. Meristemóides, tanto de origem direta como indireta,

podem formar primórdios radiculares e raízes (Altamura, 1996). Em geral, observa-se, na maioria das espécies herbáceas, o padrão direto de formação de raízes adventícias (Hartmann et al., 1990; San-José et al., 1992).

O objetivo deste estudo foi analisar a origem dos primórdios e a anatomia de raízes adventícias formadas em microestacas de *G. macrocephala* na presença e na ausência de auxina no meio de cultura, visando relacionar estes parâmetros anatômicos com a capacidade de aclimatização das microestacas.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Seguindo os procedimentos de Mercier et al. (1992), sementes de *G. macrocephala* St.-Hil., (SP167468, número de registro no Herbário do Estado “Maria Eneyda P. Kauffmann Fidalgo”, segundo Young et al., 1997), coletadas de plantas crescendo no cerrado (Itirapina, SP, 22°14’S e 47°49’O), foram desinfestadas com álcool etílico 70% (v/v) durante 1 minuto e em hipoclorito de sódio 2% (v/v) contendo poucas gotas de “Tween 20” por 20 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada esterilizada e, então, colocadas para germinar em meio de cultura contendo os sais e vitaminas do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 2,3 g.L⁻¹ fitagel (Sigma), e pH ajustado para 5,8. As plântulas obtidas nestas condições providas de três nós foram utilizadas para fornecer os segmentos nodais. As microestacas, obtidas a partir das brotações dos segmentos nodais, foram enraizadas em meio MS contendo 10 mg.L⁻¹ IBA (Mercier et al., 1992) e em meio MS desprovido de fitorregulador (tratamento controle). Cada frasco (350ml) recebeu 50 ml de meio e foi fechado com tampa plástica. Todas as culturas *in vitro* foram mantidas a 25 ± 2°C, sob lâmpadas fluorescentes e incandescentes (50,8 ± 6,6 μmol.m⁻².s⁻¹), e fotoperíodo de 12h.

Três amostras da base de microestacas foram coletadas, a cada 5 dias, de cada tratamento de enraizamento, desde o dia 0 até o 45^o dia de cultura. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), desidratadas em série etílica (10 a 100%), e então embebidas em historesina glicol metacrilato (Reichert-Jung). As seções transversais (5 μ m), obtidas em micrótomo rotativo, foram coradas com azul de toluidina (Sakay, 1975).

Amostras de raízes adventícias desenvolvidas nas duas condições de cultivo foram cortadas à mão livre. As seções foram coradas com verde-iodo e vermelho-congo, segundo Dop & Gautié (1928).

Foram tiradas fotomicrografias dos materiais preparados em lâminas histológicas.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estrutura anatômica da base das microestacas de *G. macrocephala* no dia 0 (Figura 1) apresentava epiderme unisseriada provida de tricomas tectores e estômatos. No córtex, o parênquima cortical era constituído por cerca de seis camadas de células isodiamétricas, sendo que a endoderme não era morfológicamente distinta. O cilindro central apresentava o periciclo uni ou bisseriado, com células parenquimáticas menores que aquelas do córtex (Figura 1, seta). O sistema vascular mostrava faixa procambial contínua e, em alguns setores, já evidenciando elementos diferenciados do protofloema e do protoxilema. A medula era bem desenvolvida e constituída de células parenquimáticas isodiamétricas.

Dez dias depois que as microestacas foram colocadas para enraizar, puderam ser observadas diferenças morfológicas entre os explantes: alguns desenvolveram raízes, enquanto outros limitaram-se a mostrar um espessamento da base. Após o 10^o dia, as microestacas do tratamento

controle apresentavam a formação de primórdios radiculares a partir das divisões do periciclo (Figura 2, seta) e, portanto, em estreita associação com o cilindro vascular. O processo de desenvolvimento destes primórdios radiculares assemelhava-se ao descrito por Esau (1977), tinham origem endógena, formavam-se nas proximidades dos tecidos vasculares, crescendo através dos tecidos localizados ao redor do seu ponto de origem e estabelecendo a conexão vascular com a microestaca (Figura 3).

As microestacas tratadas com IBA no 10^o dia de cultivo apresentavam estrutura anatômica bastante alterada (Figura 4). Nos vários planos de corte, a epiderme e o córtex já não eram discerníveis devido à intensa atividade mitótica das células do parênquima cortical e medular (seta), levando à formação do calo. O cilindro vascular, embora alterado, ainda podia ser visualizado. Os primórdios radiculares originavam-se de duas maneiras: diretamente a partir de divisões no periciclo, como foi observado no tratamento controle e indiretamente a partir de meristemóides formados nas regiões periféricas do calo (Figura 5). Esta variação de origem de raízes adventícias já havia sido relatada por Hartmann et al. (1990) e De Klerk et al. (1995), que mencionaram a formação de primórdios radiculares diretamente a partir de tecidos da estaca, ou indiretamente, via calo. Altamura (1996) mencionou que os meristemóides, tanto de origem direta como indireta, podem formar primórdios radiculares e raízes. As raízes adventícias formadas a partir de meristemóides de origem indireta geralmente não estabeleciam a conexão vascular com a microestaca (Figura 6).

Friedman et al. (1979), estudando o enraizamento de explantes formados por hipocótilos de *Phaseolus vulgaris* e Plüss & Schmid (1988), com *Populus tremula*, verificaram que o tratamento com substância auxínica não modificou o processo de formação e desenvolvimento de raízes adventícias do ponto de vista histológico. No presente estudo, entretanto, foi verificado que o

local de origem dos primórdios foi alterado pela presença de substância auxínica. De fato, o efeito de IBA pode provocar alterações em algumas espécies, como mostra o trabalho de Hilaire et al. (1996), onde foi observado que o aumento na concentração de IBA provocou aumento no número de raízes. Estas raízes, formadas nas microestacas tratadas de *Mussaenda erythrophylla*, apresentavam clara conexão vascular. As microestacas não tratadas, entretanto, apresentavam a formação de calo que, conforme mostraram os autores, provocou o atraso na formação das poucas raízes apresentadas pelas microestacas não tratadas com IBA.

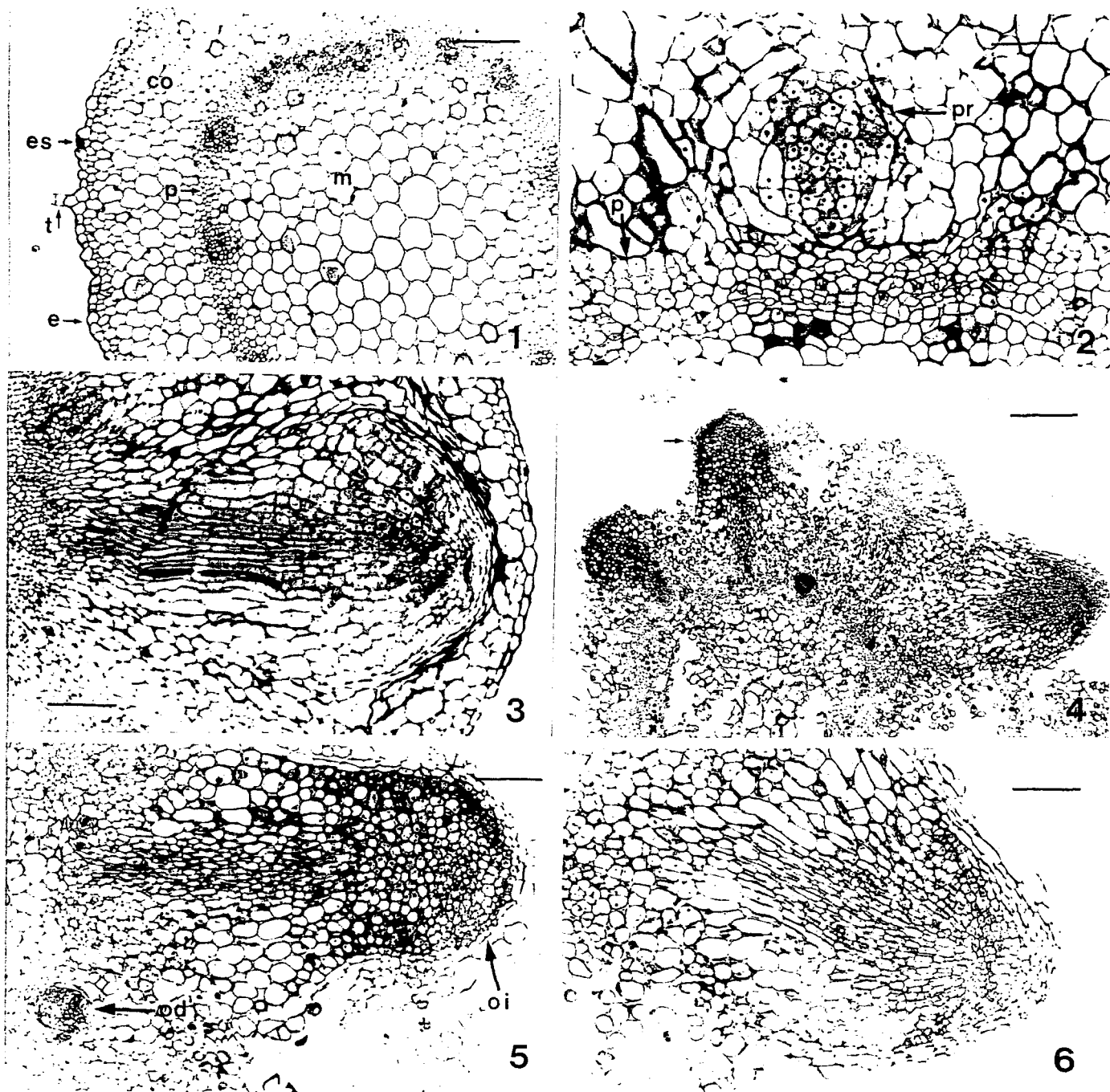
Essa espécie apresenta comportamento exatamente contrário ao das microestacas de *G. macrocephala*, que apresentaram calo somente nas estacas tratadas com IBA (Figura 7). As raízes formadas em microestacas tratadas com IBA eram espessas e quebradiças (Figura 7-A). No entanto, as raízes adventícias formadas em microestacas do tratamento controle (sem IBA), originadas sempre na camada pericíclica, mostraram-se mais finas e de aparência semelhante às raízes de plântulas (Figura 7-B).

A qualidade do sistema radicular, como mencionado por Gonçalves (1998), pode ser o fator-chave no sucesso do processo de aclimatização. A conexão incompleta entre brotações e raízes de couve-flor enraizadas *in vitro*, resultaram em insuficiente translocação de água para a parte aérea, comprometendo a aclimatização (Grout & Aston, 1977). A diferença morfológica observada entre as raízes adventícias dos dois tratamentos sugeriu que estas poderiam apresentar estrutura anatômica diferente, que por sua vez, proporcionariam alteração no desempenho durante aclimatização.

De fato, a estrutura anatômica das raízes adventícias desenvolvidas em microestacas enraizadas na ausência de IBA (Figuras 8 e 9) era similar àquela encontrada nas plântulas *in vivo*. A epiderme era unisseriada, o parênquima cortical possuía cerca de quatro camadas de células isodiamétricas, deixando

amplos espaços intercelulares. A endoderme apresentava estrias de Caspary evidentes (Figura 9, seta). O cilindro central era constituído pelo periciclo unisseriado e pelos cordões de floema primário alternados com cordões de xilema primário. A raiz era protostélica. Por outro lado, a estrutura anatômica das raízes adventícias de microestacas desenvolvidas na presença de IBA (Figuras 10 e 11) apresentava células do parênquima cortical hipertrofiadas e o cilindro vascular mal formado, com pólos de xilema primário poucos definidos. A raiz não apresentava a organização protostélica característica (Figura 11). Estes dados confirmam as observações de Davies et al. (1982) de que primórdios radiculares diferenciados a partir de calos podem desenvolver raízes mal formadas.

O presente estudo confirma que microestacas de *G. macrocephala* podem ser propagadas *in vitro*, conforme Mercier et al. (1992). Mas mostra também que as microestacas enraizadas em meio de cultura suplementado com IBA, na concentração utilizada, não sobrevivem por períodos maiores que três meses após serem transplantadas para casa de vegetação. Isto é devido ao fato de apresentarem frágil conexão vascular entre o sistema radicular e a parte aérea e por apresentarem raízes mal formadas, com alterações no cilindro vascular e hipertrofia de células corticais, o que, provavelmente, comprometem o seu desempenho. As microestacas enraizadas na ausência de reguladores vegetais, por sua vez, apresentam o mesmo tipo de raízes formadas pelas plântulas provenientes da germinação de sementes. Estas microestacas apresentam taxa de sobrevivência ao processo de aclimatização superior a 90%. Os resultados obtidos sugerem que microestacas de *G. macrocephala* dependem da formação de raízes adventícias, com estrutura anatômica normal e adequada conexão vascular para que aclimatização ocorra com sucesso.



Figuras 1-6. Seções transversais da base de microestaca de *Gomphrena macrocephala*. 1: dia 0. A seta mostra o periciclo. e = epiderme, t = tricoma, es = estômato, co = córtex, p = periciclo, m = medula; (barra = 204,6 μ m); 2: dia 10; mostrando o desenvolvimento do primórdio radicular (pr) com origem direta, ou seja, a partir do periciclo proliferado (p), como indicado pela seta (barra = 204,6 μ m); 3: dia 10, evidenciando o desenvolvimento do primórdio radicular de origem direta. A seta mostra a conexão vascular (barra = 204,6 μ m); 4: dia 10, mostrando várias raízes em diferentes fases de desenvolvimento, (barra = 552,4 μ m); 5: detalhe da seção anterior, evidenciando primórdios radiculares de origem direta (od) e indireta (oi), na mesma microestaca (barra = 204,6 μ m); 6: outro detalhe da figura 4, mostrando uma raiz na região periférica da microestaca, de origem indireta (barra = 204,6 μ m).

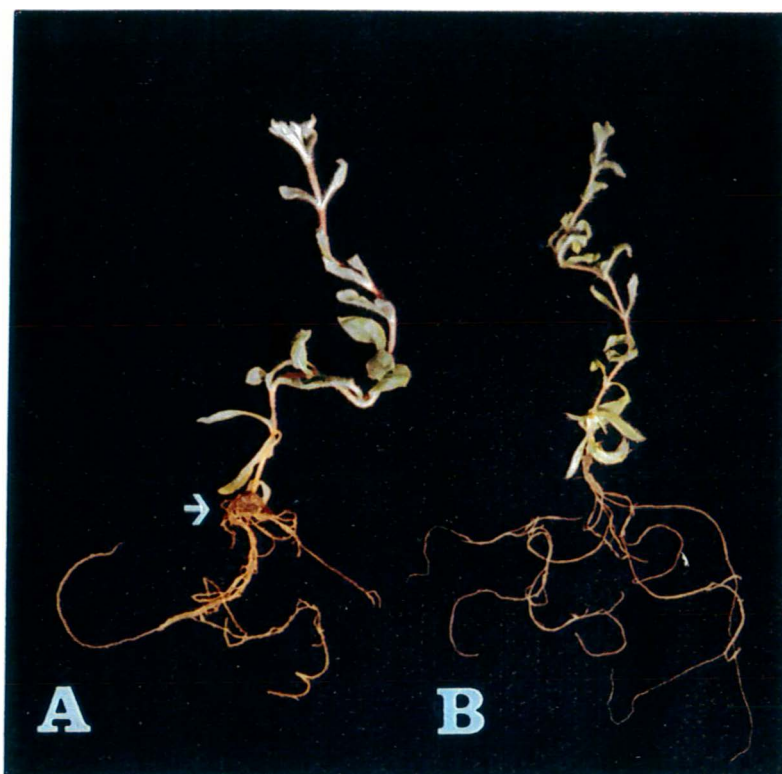
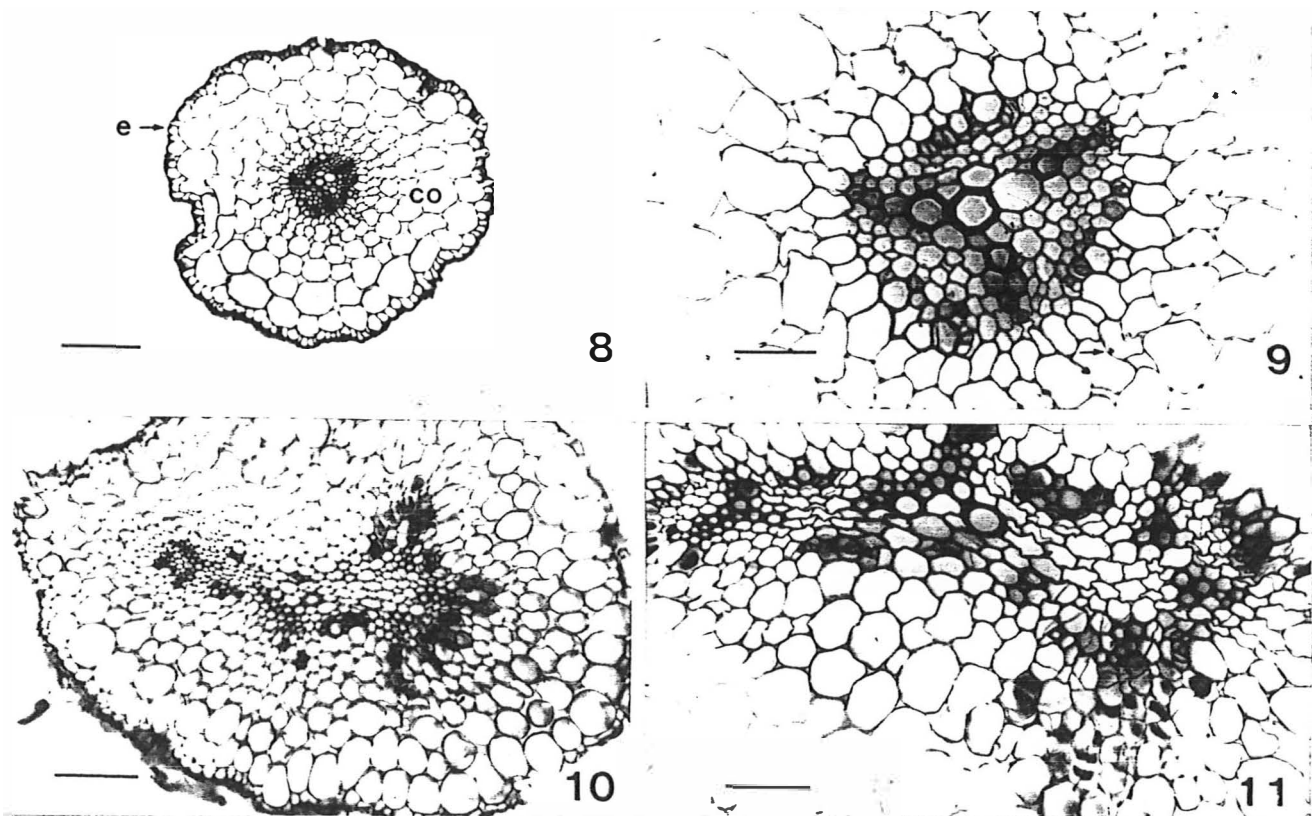


Figura 7. Plantas de *Gomphrena macrocephala* enraizadas *in vitro*. A. Planta proveniente de microestaca enraizada em meio MS contendo IBA 10 mg.L⁻¹; a seta indica a presença de calo. B. Planta proveniente de microestaca enraizada na ausência de reguladores vegetais, mostrando o desenvolvimento de raízes mais finas, e ausência de calo.



Figuras 8-11 Seções transversais de raízes adventícias desenvolvidas em microestacas mantidas nos dois tratamentos. 8: tratamento controle (não tratada com regulador vegetal) no dia 20 (e = epiderme, co = córtex). Observa-se que a raiz é protostélica (barra = 204,6 μ m); 9: detalhe da seção anterior, mostrando a endoderme com estrias de Caspary (seta) e o cilindro vascular (barra = 53,2 μ m); 10: microestaca tratada com IBA 10 mg.L⁻¹ no dia 20, podendo ser observada raiz com hipertrofia de células corticais (barra = 10,3 μ m); 11: detalhe da seção anterior, mostrando a alteração do cilindro vascular provocada pelo efeito do regulador vegetal. A raiz, neste caso, não apresenta organização protostélica característica (barra = 53,2 μ m).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTAMURA, M.M. Root histogenesis in herbaceous and woody explants cultured *in vitro*. A critical review. **Agronomie**, v.16, p.589-602, 1996.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; ESTELITA, M.E.M. Caracteres anatômicos da propagação vegetativa de *Mandevilla illustres* (Vell.) Woodson e de *M. velutina* (Mart. ex-Stadelm.) Woodson - Apocynaceae. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, 9., Salvador, 1995. **Anais...** salvador: SBSP, 1995. p.5-13.
- DAVIES, Jr. F.T.; LAZARTE, J.E.; JOINER, J.N. Initiation and development of roots in juvenile and mature leaf bud cuttings of *Ficus pumila* L. **American Journal of Botany**, v.69, n.5, p.804-811, 1982.
- DE KLERK, G.J.; KEPPEL, M.; TER BRUGGE, J.; MEEKES, H. Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings. **Journal of Experimental Botany**, v.46, n.289, p.965-972, 1995.
- DOP, P.; GAUTIÉ, A. **Manual de Technique Botanique**. 2ed. Paris: J. Lamarre, XXII. 1928. 594p.
- ESAU, K. **Anatomy of seed plants**. New York: John Wiley & Sons, 1977. 550p.
- FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; DIETRICH, S.M.C.; CHU, E.P.; MACHADO DE CARVALHO, M.A.; VIEIRA, C.C.J.; GRAZIANO, T.T. Reserve carbohydrates in underground organs of native brazilian plants. **Revista Brasileira de Botânica**, v.9, p.,159-166, 1986.

FRIEDMAN, R.; ALTMAN, A.; ZAMSKI, E. Adventitious root formation in bean hypocotyl cuttings in relation to IAA translocation and hypocotyl anatomy. **Journal of the Experimental Botany**, v.30, p.769-777, 1979.

GASPAR, T. Rooting and flowering, two antagonistic phenomena from a hormonal point of view. In: JEFFCOAT, B. (Ed.) **Aspects and prospects of plant growth group regulators**. Wantage: British Plant Growth Group, p.39-49, 1981.

GONÇALVES, J.C.; DIOGO, G.; AMÂNCIO, S. *In vitro* propagation of chestnut (*Castanea sativa* x *C. crenata*): Effect of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. **Scientia Horticulturae**, v.72, p.265-275, 1998.

GROUT, B.W.W.; ASTON, M.J. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xilem regeneration. **Horticulture Research**, v.17, p.1-7, 1977.

HARTMAN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, J.T. **Plant Propagation**. Principles and Practices. 5.ed., Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1990. p.204-205.

HILAIRE, R.S.; BERWART, C.A.F.; PÉREZ-MUÑOZ, C.A. Adventitious root formation and development in cuttings of *Mussaeda erythrophylla* L. Schum & Thorn. **Hortscience**, v.31, n.6, p.1023-1025, 1996.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for a use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.27, p.137-138, 1965.

- LOVELL, P.H.; WHITE, J. Anatomical changes during adventitious root formation. In: JACKSON, M.B. (Ed.) **New root formation in plants and cuttings**. Martinus Nijhoff, Dordrecht. The Netherlands, 1986. p.111-140.
- MERCIER, H.; VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a Brazilian medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.28, p.249-254, 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- PLÜSS, R.; SCHMID, A. The anatomy of adventitious root formation in greenwood cuttings of *Populus tremula* L. **Botanica Helvética**, v.98, p.97-102, 1988.
- RIZZINI, C.T.; HERINGER, E.P. Estudos sobre os sistemas subterrâneos difusos de plantas campestres. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.38, p.85-112, 1966.
- SAKAY, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue 01. **Stain Technology**, v.48, p.247-249, 1975.
- SAN-JOSÉ, M.C.; VIDAL, N.; BALLESTER, A. Anatomical and biochemical changes during root formation in oak and apple shoots cultured *in vitro*. **Agronomie**, v.12, p.767-774, 1992.
- SIQUEIRA, J.C. Importância alimentícia e medicinal das Amaranáceas do Brasil. **Acta Biológica Leopold**, v.9, p.99-110, 1987.

VIEIRA, C.C.J. Flutuações sazonais e caracterização parcial dos carboidratos solúveis do órgão subterrâneo de *Gomphrena officinalis* Mart. (Amaranthaceae). São Paulo, 1991. 120p. (Dissertação) Mestrado - Universidade de São Paulo.

VIEIRA, C.C.J.; MERCIER, H.; CHU, E.P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. *Gomphrena* species (globe amaranth): *In vitro* culture and production of secondary metabolites. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.) **Biotecnology in Agriculture and Forestry**. Springer-Verlag, Berlin & Heidelberg, v.28, p.257-270, 1994.

YOUNG, M.C.M.; POTOMATI, A.; CHU, E.P.; HARAGUCHI, M.; YAMAMOTO, M.; KAWANO, T. ^{13}C NMR analysis of monodesmosidic saponins from *Gomphrena macrocephala*. **Phytochemistry**, v.46, n.7, p.1267-1270, 1997.

4. EFEITO DO FOTOPERÍODO NO CRESCIMENTO E NO PADRÃO DE ACÚMULO DE CARBOIDRATOS EM PLANTAS DE *Gomphrena macrocephala* ST.-HIL. (AMARANTHACEAE)

RESUMO

Gomphrena macrocephala é uma espécie herbácea perene, nativa do cerrado brasileiro, que apresenta propriedades medicinais e potencial ornamental. Como outras espécies do cerrado, apresenta fases fenológicas bem definidas. A espécie tem sido estudada em função do acúmulo de carboidratos, do tipo frutano, em sua raiz tuberosa, cujo padrão de variação está relacionado com as fases fenológicas. O presente estudo utilizou plantas micropropagadas e aclimatizadas, e teve como objetivo investigar a presença de frutanos em raízes tuberosas e verificar se as condições fotoperiódicas interferem no crescimento, no comportamento fenológico e no acúmulo de frutanos dessas plantas. Foi verificado que, as condições fotoperiódicas têm efeito na partição dos carboidratos. Dias curtos (8h) proporcionaram menor crescimento vegetativo, induziram características de senescência e acúmulo de polissacarídeos, como já descrito para plantas em início de dormência. Dias longos (12 h e 16 h), no entanto, estimularam maior desenvolvimento da parte aérea e acúmulo de carboidratos semelhante ao observado em plantas em fase de crescimento vegetativo.

Palavras-chave: *Gomphrena*, efeito do fotoperíodo, acúmulo de frutano.

**EFFECT OF FOTOPERIOD ON GROWTH AND ON FRUCTAN
ACCUMULATION PATTERN IN ACCLIMATIZED PLANTS OF
Gomphrena macrocephala St.-Hil. (AMARANTHACEAE)**

SUMMARY

Gomphrena macrocephala is a perennial herb, native to the Brazilian cerrado, with medicinal properties and ornamental potential. As with other plants of the cerrado, it is characterized by well defined phenological phases. This species has been studied because of its particular frutan accumulation in the tuberous root, the variation of these carbohydrates being related with phenological phases. Micropropagated and acclimatized plants were used in the present study to investigate the presence of frutans in tuberous roots and to verify if the photoperiodic conditions interfere on growth, phenological behavior and on frutans accumulation.. Short days (8h) provide lower shoot growth, and induced the appearance of senescence characteristics and accumulation of polysaccharides, as already reported to plants in early dormancy. Long days (12 and 16 h), however, increased shoot growth and the resulted in lower fructan contents, similar to what is observed in the vegetative growth phase of this plant.

Key Words: *Gomphrena*, photoperiodic effect, frutan accumulation .

4.1. INTRODUÇÃO

Gomphrena macrocephala (Amaranthaceae) é uma espécie herbácea perene que cresce espontaneamente no cerrado brasileiro (Vieira & Figueiredo-

Ribeiro, 1993). Apresenta um ciclo de desenvolvimento anual com fases fenológicas bem caracterizadas. No outono, a parte aérea de *G. macrocephala* senesce e o órgão subterrâneo de reserva permanece dormente durante o inverno. Na primavera ocorre uma intensa brotação e crescimento vegetativo, vindo a planta a florescer e frutificar. no verão. Esse padrão é comum à outras espécies herbáceas perenes do cerrado (Isejima et al. 1991; Carvalho et al., 1997). O comportamento fenológico desta vegetação parece representar uma série de estratégias adaptativas para superar estresses térmicos, hídricos e nutricionais (Mantovani & Martins, 1988). A redução na produção de matéria seca durante o outono e inverno coincide com o período do ano em que ocorre menor disponibilidade de água, redução da temperatura e do comprimento do dia (Coutinho, 1982; Mantovani & Martins, 1988).

Pertencente à sub-classe Caryophyllidae, *G. macrocephala*, é a única espécie deste grupo onde foi constatada a presença de frutanos, os quais representam cerca de 40% da matéria seca da raiz tuberosa (Vieira, 1991; Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993). Frutanos são carboidratos constituídos basicamente de série homólogos de oligo- e polissacarídeos não redutores, contendo resíduos de frutose ligados a uma molécula de sacarose (Edelman & Jefford, 1968; Figueiredo-Ribeiro et al., 1991). São prontamente disponíveis e, têm sido encontrados em órgãos de reserva de algumas espécies herbáceas perenes do cerrado, principalmente nas asteráceas (Figueiredo-Ribeiro et al., 1991). A presença de frutanos provavelmente confere às plantas maior capacidade de explorar ambientes cuja disponibilidade de água é limitada (Hendry, 1993), como ocorre em regiões do cerrado. De fato, os frutanos de órgãos subterrâneos de plantas do cerrado, além de atuarem no armazenamento de energia, parecem estar relacionados com processos de osmorregulação (Figueiredo-Ribeiro, 1993).

Segundo Vieira (1991), o perfil cromatográfico dos carboidratos acumulados no órgão de reserva de *G. macrocephala* mostra que estes estão distribuídos em série homóloga única e não correspondem à série da inulina (ligações β -2,1), típica das dicotiledôneas (Pollock & Chatterton, 1988). Considerando a co-eluição dos carboidratos acumulados no órgão subterrâneo de *G. macrocephala* com padrões conhecidos de frutanos, Vieira (1996) sugeriu que aqueles seriam do tipo β -2,6, embora os frutanos encontrados em dicotiledôneas, até então, apresentassem ligação do tipo β -2,1 e os frutanos com ligação do tipo β -2,6 predominassem entre as gramíneas. Posteriormente, através de métodos físico-químicos, foi confirmado que os polissacarídeos de alto peso molecular de *G. macrocephala* são fleanos lineares com ligação do tipo β -2,6 (Shiomi et al., 1996; Vieira, 1996).

Vieira & Figueiredo-Ribeiro (1993) observaram a ocorrência de variações sazonais na quantidade e na composição dos frutanos de *G. macrocephala*: no final do período de dormência ocorre aumento no teor de polissacarídeos concomitantemente à redução na quantidade de oligossacarídeos. Nas fases de brotação e crescimento vegetativo, é observado um aumento dos oligossacarídeos e polissacarídeos de baixo peso molecular e, na fase reprodutiva e no início de dormência, há um aumento no peso molecular dos polissacarídeos e redução no teor de oligossacarídeos (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993).

Além de acumular frutanos do tipo fleano, *G. macrocephala* é uma espécie interessante do ponto de vista econômico pela produção de saponinas esteroidais, utilizadas na produção de hormônios sexuais, e pelo seu potencial ornamental, este em função da sua inflorescência púrpura, do tipo capítulo, extremamente bela (Vieira et al., 1994).

G. macrocephala é uma espécie de difícil propagação. A propagação vegetativa pode ocorrer através de brotações de gemas localizadas na raiz

tuberosa, porém esse processo é limitado em função do lento crescimento das raízes. A reprodução sexuada é também restrita, tendo em vista o reduzido número de sementes viáveis. A micropropagação tem sido uma boa alternativa para multiplicação desta espécie (Mercier et al., 1992). Estudos prévios (Vieira, 1996) mostraram, ainda, que tecidos cultivados *in vitro*, incluindo raízes adventícias de plantas micropropagadas, acumulam frutano. No entanto, esses frutanos são exclusivamente do tipo inulina, ao contrário das raízes de plantas propagadas e condições naturais, que acumulam fleanos.

O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de frutanos em raízes tuberosas de plantas aclimatizadas e verificar se as condições fotoperiódicas são capazes de influenciar o crescimento, interferindo no comportamento fenológico das plantas e no padrão de acúmulo de carboidratos das raízes tuberosas.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. foram coletadas em região de cerrado no município de Itirapina, SP (22°18'S e 47°11'O). Um exemplar dessa população está documentado no Herbário do Estado "Maria Eneyda P. Kaffmann" (SP167648), do Instituto de Botânica. As plantas matrizes foram obtidas a partir de germinação de sementes *in vitro*. Microestacas desenvolvidas a partir de gemas axilares dos explantes nodais retirados das plântulas *in vitro* (Mercier et al., 1992) foram enraizadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) desprovidos de fitorreguladores. Após 30 dias em meio de enraizamento (Moreira et al., 1998), as plantas foram transferidas, individualmente, para bandejas de plástico contendo terra de cerrado. A aclimatização foi feita em casa de vegetação, com luz natural, temperatura de

28°C ± 3°C, umidade relativa de 95% e irrigação por aspersão cerca de oito vezes ao dia.

As plantas foram aclimatizadas por 50 dias antes do início do tratamento fotoperiódico, no final de março de 1998. Para cada tratamento fotoperiódico (8h, 12h e 16h) foram utilizadas 12 plantas, em vasos individuais. Todas as plantas receberam 8h de luz natural em casa de vegetação com irradiância média correspondente a 80% da irradiância natural. A fim de complementar o fotoperíodo necessário, o tempo de exposição à luz foi suplementado em câmaras com controle automático de iluminação, consistindo de lâmpadas do tipo luz do dia especial (40W) da Osram-Universal, e uma lâmpada de tungstênio da General Electric (100W), totalizando um fluxo de energia de 3,5 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ à altura das plantas. A irrigação foi feita diariamente ou quando se fez necessário.

A cada 20 dias, foram observados o número de pares de folhas, o comprimento da haste e o número de novas brotações.

Para as análises de frutanos, amostras de raízes tuberosas de duas plantas por tratamento foram retiradas após 140 dias do início do tratamento fotoperiódico. Estas foram congeladas (-80°C) e liofilizadas até atingirem peso constante. Depois de mensuradas a massa fresca e seca, as amostras foram separadas em três partes, cada uma constituindo uma repetição.

A extração de frutanos a partir das amostras liofilizadas das raízes tuberosas foi feita de acordo com o método estabelecido por Pollock & Jones (1979) adaptado para *G. macrocephala*, conforme descrito detalhadamente em Vieira (1996). Os extratos foram cromatografados no sistema ©Dionex, que consiste na cromatografia de troca aniônica de alto desempenho (HPAEC), usando-se colunas CarboPac™PA1 (4 x 250 mm) e CarboPac™PA 100 (4 x 250 mm), com detecção de pulso amperométrico (PAD). Os resultados foram registrados através de um integrador Hewlett-Packard, sendo comparados com extratos de raízes tuberosas de *G. macrocephala* coletadas

no cerrado e de tubérculos de *Helianthus tuberosus* (Pollock & Jones, 1979), estes últimos considerados padrão neste tipo de trabalho (Teixeira et al., 1997).

A quantificação de frutose total, livre e combinada, foi determinada pelo método descrito por Jermyn (1956), utilizando D-frutose como padrão e expressa como média dos valores obtidos.

Com o intuito de verificar o tipo de frutano presentes em plantas aclimatizadas, por um longo período, foi também avaliado o carboidrato acumulado em plantas aclimatizada após dois anos, utilizando-se a mesma metodologia descrita acima.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de crescimento da parte aérea (comprimento de haste e número de pares de folhas), foram maiores quando as plantas foram submetidas a fotoperíodo de 12h (TABELA 1, Figura 1). Dias mais longos induziram maior número de brotações a partir de gemas localizadas na porção basal da raiz tuberosa (TABELA 1). Esses resultados sugerem que os parâmetros de crescimento analisados são regulados pelo fotoperíodo. Thomas & Vince-Prue (1997) afirmaram ser possível generalizar que plantas submetidas a dias longos apresentam maior crescimento vegetativo, algumas vezes diretamente em função do fotoperíodo, outras como resultado da atividade fotossintética.

No Estado de São Paulo, a variação do fotoperíodo é de 10,5 e 13,5h (Vianello & Alves, 1991), tendo em vista que em *G. macrocephala* houve menor produção de folhas nos fotoperíodos de 8 h e 16 h, é possível que fotoperíodos aquém ou além da faixa possam realmente constituir uma condição desfavorável para o crescimento de algumas espécies que ocorrem

naturalmente nesta região (Ruggiero & Zaidan, 1997). Klein et al. (1996) observaram que plantas de *Bidens gardneri* Baker, uma espécie herbácea perene, também do cerrado, apresentaram maior desenvolvimento da parte aérea sob fotoperíodos intermediários (12h, 14h, 16h), tendo registrado menores valores de crescimento nas plantas mantidas em fotoperíodos mais curtos ou mais longos do que os mencionados.

Menor crescimento vegetativo foi observado quando as plantas foram submetidas a fotoperíodo de 8 h (TABELA e Figura 1). Este resultado coincide com os dados observados para outras espécies perenes do cerrado, como *Vernonia cognata* (Cesarino, 1996), *Viguiera robusta* (Ruggiero & Zaidan, 1997). Algumas plantas de *G. macrocephala*, em fotoperíodo de 8 h apresentaram característica de senescência e perderam a parte aérea durante o período de estudo. No entanto, não foi possível afirmar que essas plantas poderiam estar em dormência, ou que foram induzidas à dormência por dias curtos. *G. macrocephala*, quando em condições naturais, apresenta menor crescimento e perde a parte aérea, entrando em dormência no final do outono, quando o fotoperíodo está gradativamente diminuindo (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993).

A TABELA 2 mostra os valores de massa fresca e seca, e os teores de frutose total das raízes tuberosas de *G. macrocephala* nos diferentes tratamentos fotoperiódicos após 140 dias. Maior acúmulo de massa seca e frutose total foi observado no fotoperíodo de 16h. Também foram observadas diferenças morfológicas no órgão subterrâneo de plantas tratadas nas três condições fotoperiódicas, em especial nos fotoperíodos de 8 h e 16 h (Figura 2).

A análise dos extratos de carboidratos por HPAEC mostraram a presença de uma série homóloga de frutanos (Figura 3) que co-eluíram com os fleanos extraídos de raízes tuberosas de plantas de *G. macrocephala* coletadas no cerrado.

No presente estudo, fleanos de baixo peso molecular estão presentes nas raízes tuberosas das plantas de todos os tratamentos fotoperiódicos, porém em proporções inferiores às encontradas para glicose, frutose e sacarose (Figura 3). Em nenhum tratamento fotoperiódico foi detectado frutano do tipo inulina, como ocorre normalmente em tecidos oriundos da parte aérea de *G. macrocephala*, cultivadas *in vitro* (Vieira, 1996). Esse resultado mostra que as plantas micropropagadas, depois de um período de aclimatização, passaram a apresentar acúmulo do mesmo tipo de frutano que plantas propagadas por sementes. Isto foi particularmente evidente nas plantas micropropagadas e aclimatizadas, cultivadas por dois anos em casa de vegetação (Figura 3), em cujas raízes tuberosas foram detectados os membros de baixo peso molecular da série homóloga de fleanos, típica da espécie (Vieira, 1996).

O acúmulo de frutanos em órgãos perenes, tais como tubérculos e raízes tuberosas, pode ser afetado por fatores externos e por processos de desenvolvimento que alteram a partição de compostos de reserva (Pollock, 1986; Figueiredo-Ribeiro, 1993). Carvalho et al. (1997), trabalhando com *Vernonia herbacea* (Asteraceae), uma espécie nativa do cerrado, observaram que o teor de oligossacarídeos foi maior durante o período de rápido crescimento vegetativo, concomitante à redução no teor de polissacarídeos. A variação nos teores de frutano indicou que este carboidrato é metabolizado durante o desenvolvimento da planta. O mesmo foi observado em plantas de *G. macrocephala* submetidas aos fotoperíodos mais longos (12 h e 16 h), onde a proporção de oligossacarídeos da série de frutanos foi superior àquela de polissacarídeos (Figura 4). Raízes tuberosas de plantas submetidas a 8 h de fotoperíodo apresentaram uma porção elevada de polissacarídeos em relação aos oligossacarídeos quando comparada aos demais tratamentos. Isejima et al. (1991), estudando a influência do fotoperíodo em *Viguiera discolor*, observaram

que embora a quantidade total de frutanos das raízes tuberosas tenha sido similar nos tratamentos de dias curtos e longos, a relação de polissacarídeos:oligossacarídeos foi de 10:1 em dias curtos e 6:1 em dias longos. Esses autores mostraram ainda que os polissacarídeos de inulina predominaram nas raízes tuberosas em todos os tratamentos, ocorrendo em maior quantidade nas plantas induzidas para floração.

A floração em plantas de *G. macrocephala*, não foi observada em nenhum dos tratamentos fotoperiódicos, mesmo depois de nove meses. Existem poucos dados disponíveis sobre a floração de espécies do cerrado, conforme mencionado na revisão feita por Zaidan & Felipe (1994). Além do fotoperíodo, outros fatores ambientais, como temperatura e umidade exercem um efeito importante na indução da floração (Thomas & Vince-Prue, 1997).

Estudos feitos em condições de casa de vegetação, utilizando plantas do cerrado portadoras de órgãos subterrâneo de reserva e que foram irrigadas periodicamente, mostraram que essas plantas apresentam fases fenológicas coincidentes com as observadas em plantas crescendo naturalmente no cerrado (Figueiredo-Ribeiro & Dietrich, 1981; Isejima & Figueiredo-Ribeiro, 1991; Carvalho & Dietrich, 1993; Sá e Carvalho & Dietrich 1996; Carvalho et al., 1997). O presente estudo limitou-se a um período de nove meses que precedeu a etapa de aclimatização. Embora não tenham sido observadas as fases fenológicas já descritas para *G. macrocephala* (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993), especialmente floração e dormência, não se pode deixar de considerar que as plantas aqui estudadas originaram-se de segmentos caulinares de plântulas. Sendo assim, é provável que necessitem de um período de dormência antes de iniciar um ciclo de desenvolvimento, como já foi descrito para *V. herbacea* (Carvalho et al., 1997). Plantas de *G. macrocephala*, crescendo em canteiros próximos à casa de vegetação apresentaram floração coincidindo com o período em que floresce no cerrado (verão). Estas plantas, propagadas vegetativamente a partir de estacas radiculares de plantas trazidas do cerrado,

têm, portanto, um comportamento diferente do das microestacas formadas a partir de plântulas cultivadas *in vitro*.

Variações no teor de frutanos podem ocorrer ao longo do ciclo de vida das plantas acumuladoras, tanto em monocotiledôneas como em dicotiledôneas (Pontis, 1989). Vieira & Figueiredo-Ribeiro (1993) relacionaram as variações na composição, no conteúdo e no peso molecular dos frutanos de *G. macrocephala* com os estágios fenológicos da planta.

Apesar das diferenças observadas nos tratamentos fotoperiódicos em relação ao crescimento da parte aérea das plantas de *G. macrocephala* (TABELA 1) e o conteúdo de frutose total das raízes tuberosas (TABELA 2), não foram constatadas alterações significativas na proporção oligo- e polissacarídeos (Figura 4), com exceção do tratamento fotoperiódico de 8 h. Vieira & Figueiredo-Ribeiro (1993) observaram um padrão característico para os carboidratos de *G. macrocephala* em cada fase fenológica. De fato, plantas que cresceram em fotoperíodo de 8 h apresentaram características morfológicas (ramos secos, folhas com manchas púrpuras, ausência de gemas em brotação) e bioquímicas (acúmulo de polissacarídeos) de plantas em estado de dormência.

TABELA 1. Dados finais do crescimento (média \pm desvio padrão) em altura, número de pares de folhas, número de brotações em plantas micropropagadas e aclimatizadas de *G. macrocephala* crescendo em fotoperíodos de 8, 12 e 16h por 140 dias.

Fotoperíodo	8h	12h	16h
altura da haste (cm)	4,17 \pm 0,16	10,73 \pm 0,99	7,63 \pm 1,04
número de pares de folhas	2,79 \pm 0,13	3,66 \pm 0,17	3,06 \pm 0,24
número de brotações	1,00 \pm 0,08	1,15 \pm 0,07	1,26 \pm 0,07

TABELA 2. Valores de massa fresca e seca totais e teores de frutose encontrados no órgão subterrâneo de *G. macrocephala* após 140 dias de tratamento fotoperiódico.

Fotoperíodo	massa fresca total (g)	massa seca (g/g massa fresca)	teores de frutose (mg/gms)
8h	0,52	0,26	14,20
12h	1,27	0,23	26,20
16h	2,11	0,30	51,30

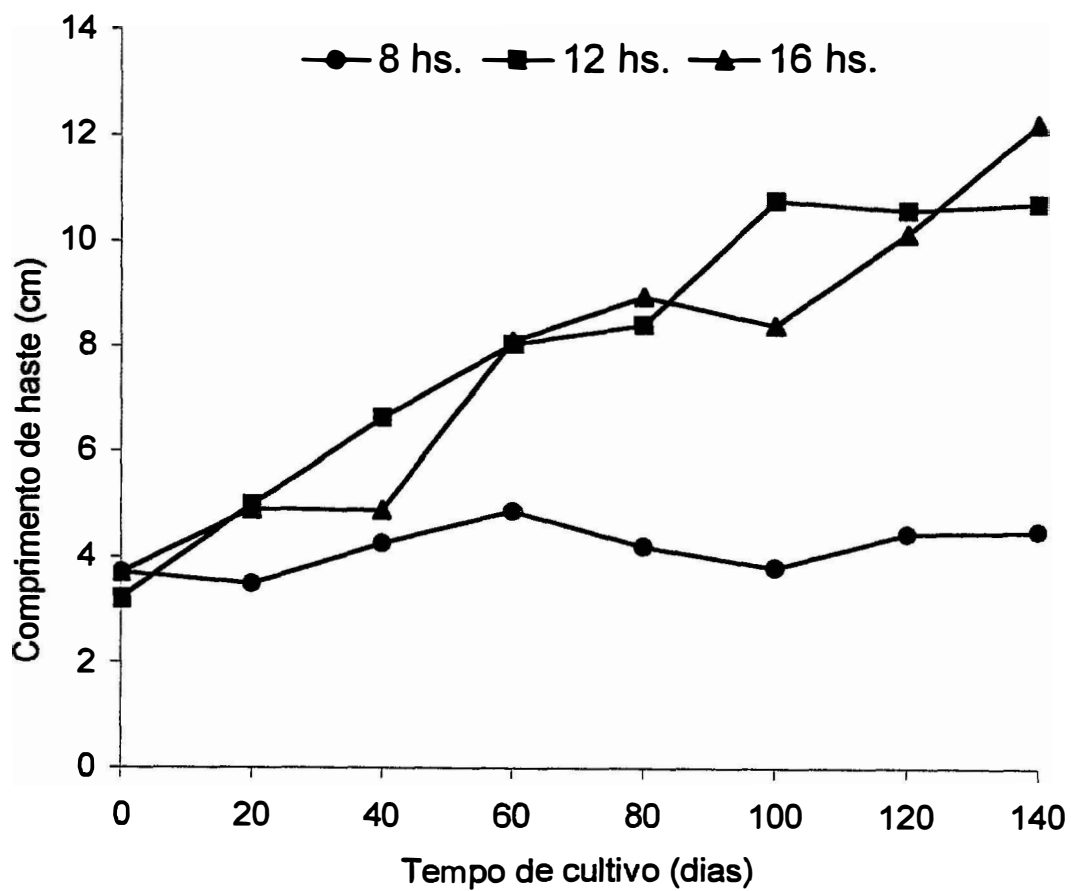


Figura 1 Curva de crescimento de plantas micropropagadas e aclimatizadas de *Gomphrena macrocephala* após 140 dias de tratamento fotoperiódico (8, 12 e 16 h).

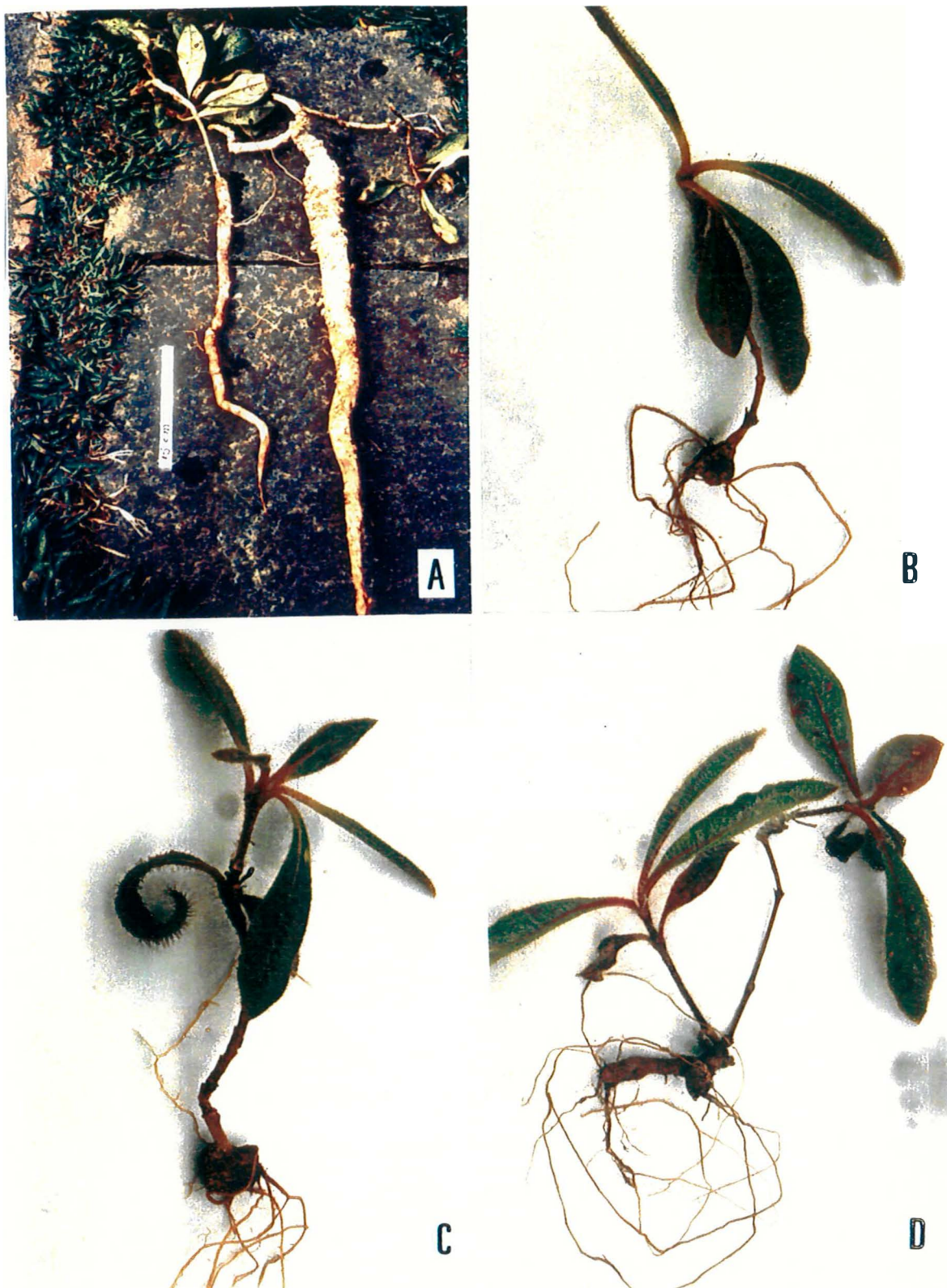


Figura 2 Plantas de *Gomphrena macrocephala*, coletadas no cerrado (A) e plantas micropropagadas e aclimatizadas após 140 dias de tratamento fotoperiódico de 8 h (B), 12 h (C) e 16 h (D).

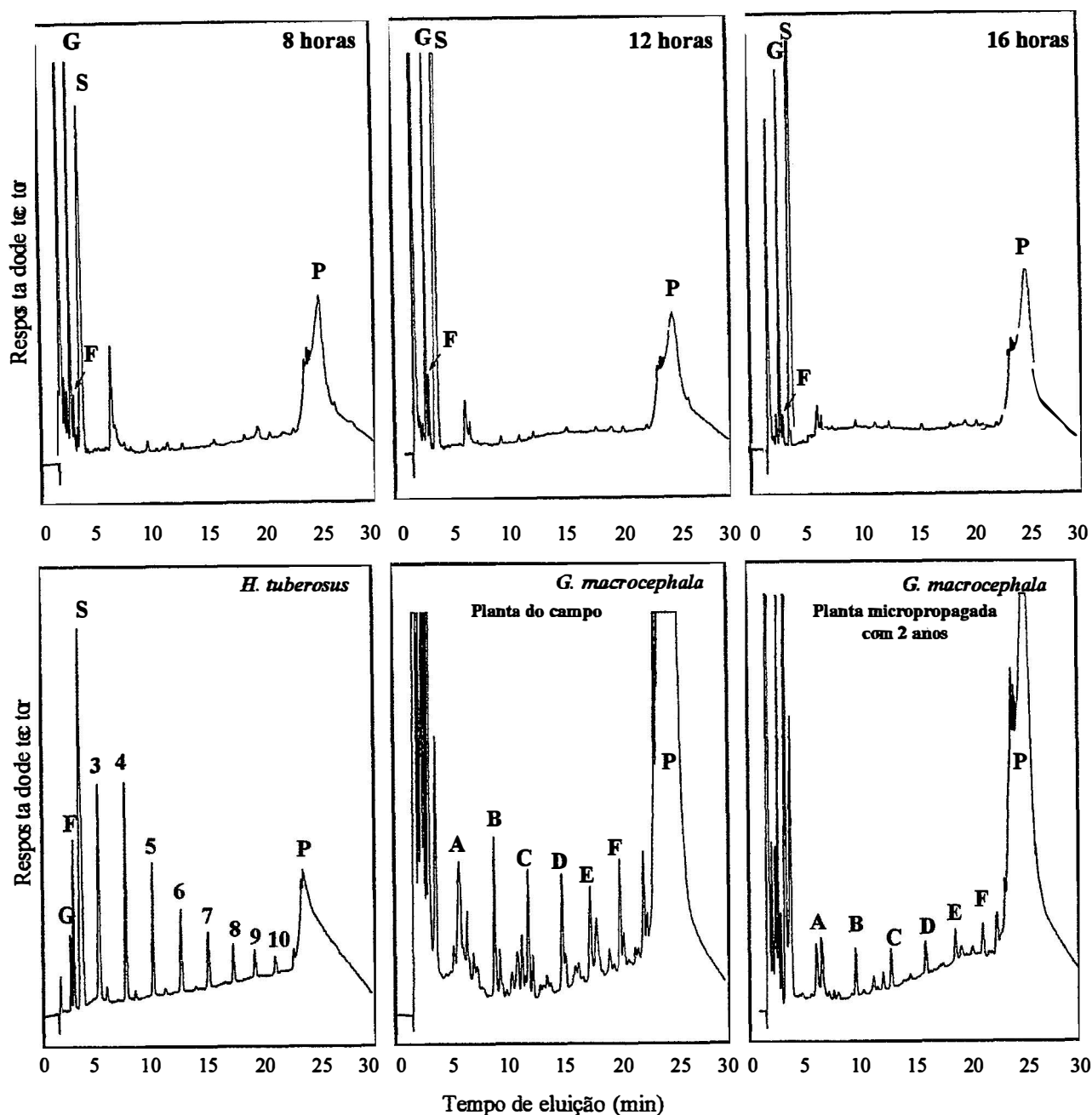


Figura 3. Análise por HPAEC, em coluna CarboPac PA1, dos oligossacarídeos presentes em raízes tuberosas de plantas de *Gomphrena macrocephala*, micropropagadas e aclimatizadas submetidas a fotoperíodos de 8, 12 e 16 horas por 140 dias. Os perfis cromatográficos foram comparados com padrões conhecidos de oligossacarídeos de inulina, obtidos de tubérculos de *Helianthus tuberosus*, e de fleanos, extraídos de raízes tuberosas de plantas de *G. macrocephala*, coletadas no campo, e de plantas micropropagadas e aclimatizadas com 2 anos de idade. G, glucose; F, frutose; S, sacarose; P, polissacarídeos; 3-10, oligossacarídeos de inulina com grau de polimerização 3 a 10; A-F, oligossacarídeos da série homóloga de fleanos de *G. macrocephala*.

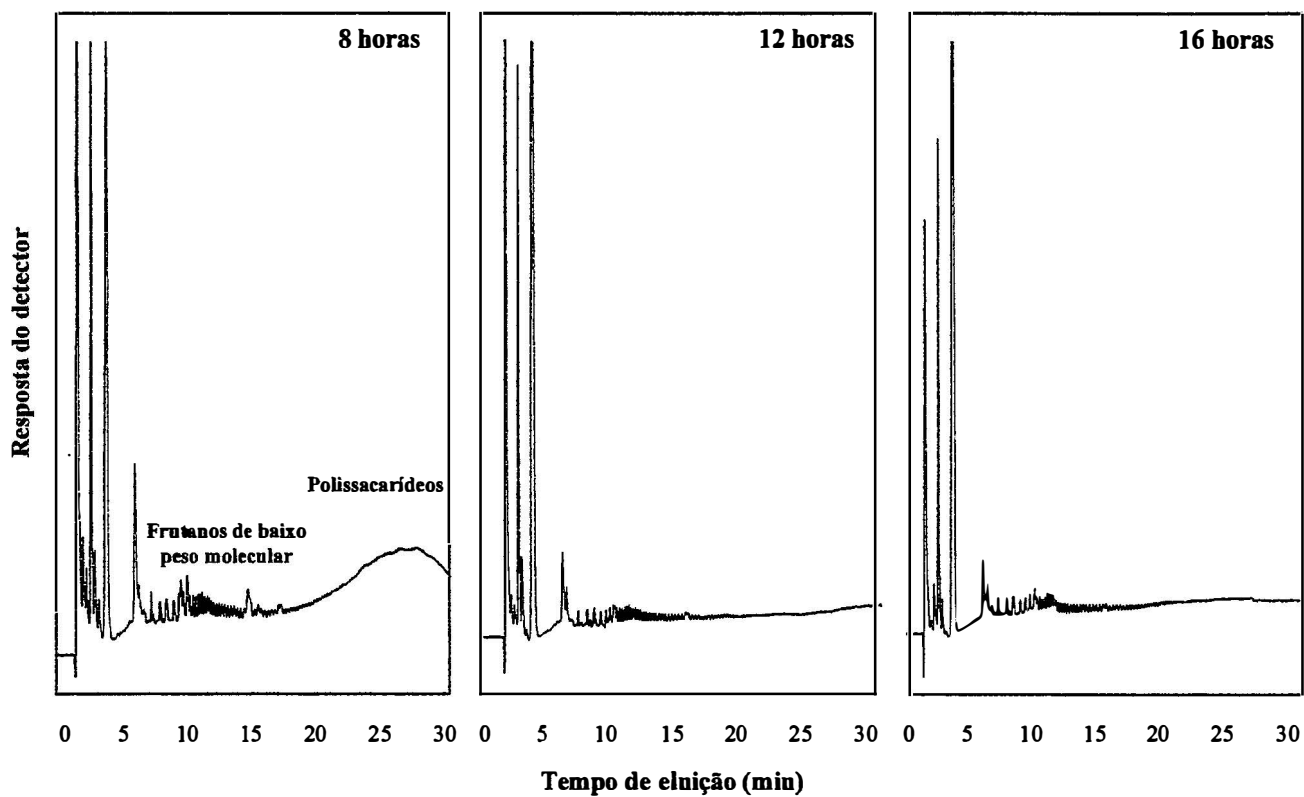


Figura 4. Análise por HPAEC, em coluna CarboPac PA100, dos polissacarídeos de raízes tuberosas de plantas micropropagadas e aclimatizadas de *Gomphrena macrocephala*, submetidas a fotoperíodos de 8, 12 e 16 horas por 140 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, M.A.M.; ZAIDAN, L.B.P.; DIETRICH, S.M.C. Growth and fructan content of plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rhizophores. **New Phytologist**, v.136, p.153-161, 1997.
- CARVALHO, M.A.M.; DIETRICH, S.M.C. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. **New Phytologist**, v.123, p.735-740, 1993.
- CESARINO, F. Crescimento de *Vernonia cognata* Less.; uma espécie herbácea de cerrado. Campinas, 1996. 76p. (Dissertação) Mestrado - Universidade Estadual de Campinas.
- COUTINHO, L.M.; VUONO, Y.S.; LOUSA, J.S. Aspectos ecológicos do fogo no cerrado. IV. A época da queimada e a produtividade primária líquida epigéia do estrato herbáceo subarbustivo. **Revista Brasileira de Botânica**, v.5, p.37-41, 1982.
- EDELMAN, J.; JEFFORD, T.G. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. **New Phytologist**, v.67, p.517-531, 1968.
- FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; DIETRICH, S.M.C. Variações estacionais nos compostos de reserva e no metabolismo do xilopódio de *Ocimum nudicaule* Benth. var. *anisifolia* giul. (Labiatae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.4, p.73-82, 1981.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; ISEJIMA, E.M.; DIAS-TAGLIACOZZO, G.M.; CARVALHO, M.A.M.; DIETRICH, S.M.C. The physiological significance of fructan accumulation in Asteraceae from the Cerrado. **Ciência e Cultura**, v.43, n.6, p.443-446, 1991.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Distribuição, aspectos estruturais e funcionais dos frutanos, com ênfase em plantas herbáceas do cerrado. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.5, n.2, p.203-208, 1993.

HENDRY, G.A.F. Evolutionary origins and natural functions of fructans - a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. **New Phytologist**, v.123, p.3-14, 1993.

ISEJIMA, E.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; Z Aidan, L.B.P. Fructan composition in adventitious tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae) as influenced by daylength. **New Phytologist**, v.119, p.149-154, 1991.

JERMYN, M.A. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. **Nature**, v.177, p.38-39, 1956.

KLEIN, A.L.; Z Aidan, B.P.; FELIPPE, G.M. Interaction between soil and photoperiod on development of *Bidens gardneri* Baker (Asteracea), a herbaceous species from the Brazilian cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v.19, n.1, p.1-15, 1996.

- MANTOVANI, W.; MARTINS, F.R. Variações fenológicas das espécies de cerrado da reserva Biológica de Mogi-Guaçu, São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v.11, p.101-112, 1988.
- MERCIER, H.; VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a Brazilian medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.28, p.249-254, 1992.
- MOREIRA, M.F.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; ZAIDAN, L.B.P. Estudos anatômicos do enraizamento *in vitro* de explantes caulinares de *Gomphrena macrocephala* St. Hill. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 49., Salvador, 1997. **Resumos...** Salvador: Universidade Federal da Bahia, 1998. p.464.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- POLLOCK, C.J. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. **New Phytologist**, v.104, p.1-24, 1986.
- POLLOCK, C.J.; CHATTERTON, N.J. Fructan. In: PREISS, J. (Ed.) **Biochemistry of plants**. London: academic Press, 1988. v.14, p.109-140.
- POLLOCK, C.J.; JONES, T. Seasonal patterns of fructan metabolism in forage grasses. **New Phytologist**, v.83, p.8-15, 1979.
- PONTIS, H.G. Fructans and cold stress. **Journal of Plant Physiology**, v.134, p.148-150, 1989.

- RUGGIERO, P.G.C.; Z AidAN, L.B.P. Estudos de desenvolvimento de *Viguiera robusta* Gardn., uma Asteraceae do Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v.20, n.1, p.1-9, 1997.
- SÁ e CARVALHO, C.G.; DIETRICH, S.M.C. Carbohydrates in tuberous roots of *Cochlospermum regium* in different stages of development. **Revista Brasileira de Botânica**, v.19, p.127-131, 1996.
- SHIOMI, N.; ONODERA, S.; VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Structure of fructan polymers from tuberous roots of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil., a herbaceous Amaranthaceae from the cerrado. **New Phytologist**, v.133, p.643-650, 1996.
- TEIXEIRA, P.G.; CARVALHO, M.A.M.; Z AidAN, L.B.P.; KLEIN, A.L. Effect on mineral nutrients on growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, n.2, p.89-96, 1997.
- THOMAS, B.; VINCE-PRUE, D. Photoperiodism in plants. San Diego: Academic Press, 2.ed. 1997. 428p.
- VIANELLO, R.L.; ALVES, A.R. Meteorologia básica e aplicações. Imprensa Universitária, 1991.
- VIEIRA, C.C.J. Flutuações sazonais e caracterização parcial dos carboidratos solúveis do órgão subterrâneo de *Gomphrena officinalis* Mart. (Amaranthaceae). São Paulo, 1991. 120p. (Dissertação) Mestrado – Universidade de São Paulo.

VIEIRA, C.C.J.; MERCIER, H.; CHU, E.P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. *Gomphrena* species (globe amaranth): *In vitro* culture and production of secondary metabolites. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Springer-Verlag, Berlin & Heidelberg, v.28, p.257-270, 1994.

VIEIRA, C.C.J. Caracterização e produção de frutanos por tecidos e órgãos isolados de *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. (Amaranthaceae). São Paulo, 1996. 160p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

ZAIDAN, L.B.P.; FELIPPE, G.N. Flowering of cerrado plants: experiments in semi-controlled environmental conditions. **Flowerings Newsletter**, v.18, p.4-11, 1994.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Gomphrena macrocephala é uma espécie que pode ser multiplicada segundo o protocolo de Mercier et al. (1992), mas que é mais facilmente aclimatizada se as microestacas forem enraizadas na ausência de reguladores de crescimento. O presente estudo mostra que na presença de IBA 10mg.L^{-1} no meio de cultura, como sugere o protocolo disponível, esta espécie apresenta formação de raízes adventícias com origem indireta, ou seja, a partir do calo que é desenvolvido nesta situação. As raízes tratadas com IBA apresentam, portanto, frágil conexão vascular com a parte aérea. Foi observado ainda que estas raízes apresentaram má formação do cilindro vascular e hipertrofia das células corticais. Estas alterações estruturais podem explicar o insucesso obtido na etapa de aclimatização.

Microestacas com raízes formadas na ausência de reguladores vegetais no meio de cultura apresentam maior índice de sobrevivência após a aclimatização possivelmente por apresentarem raízes produzidas exclusivamente por origem direta, portanto com estreita associação com as células do sistema vascular da parte aérea. Essas raízes apresentaram estrutura anatômica característica de plântulas de *G. macrocephala*.

Dados da literatura indicam que os frutanos encontrados em raízes adventícias de plantas micropropagadas são exclusivamente do tipo inulina. A análise feita com o intuito de verificar o tipo de frutano acumulado em raízes de plantas micropropagadas após 140 dias e dois anos após a aclimatização mostrou a presença de frutanos do tipo fleano, ou seja, com o mesmo tipo de

ligação β 2,6 encontrada nas raízes de plantas coletadas em áreas de cerrado. Esse resultado mostra que o cultivo *in vitro* e a posterior aclimatização consistem em uma metodologia adequada para multiplicação de plantas de *G. macrocephala*, mesmo quando o objetivo está relacionado com a produção dos carboidratos de interesse que são acumulados no órgão subterrâneo de reserva.

Não foi possível caracterizar o tipo de comportamento de *G. macrocephala* em relação à exigência de um determinado fotoperíodo para a indução da floração, uma vez que durante o período em que as plantas foram mantidas sob condições fotoperiódicas controladas não houve floração. Não podemos, no entanto, concluir que a espécie não seja induzida à floração por determinada condição de fotoperíodo, tendo em vista que, no campo, a floração é limitada aos meses de verão, portanto, quando os fotoperíodos são mais longos. A indução da floração nesta espécie merece ser estudada com mais profundidade. Aspectos como o envolvimento de outros fatores ambientais, como temperatura e umidade, associados ou não ao fotoperíodo, merecem ser investigados. Também, o comportamento das plantas micropropagadas através de microestacas provenientes de plântulas precisa ser melhor compreendido levando-se em conta aspectos como juvenilidade e adição de fitorreguladores. Um protocolo de floração de plantas de *G. macrocephala* precisa ser elaborado, principalmente quando se tem em mente a produção comercial de plantas envasadas.

Foi observado que o crescimento vegetativo de plantas de *G. macrocephala* é influenciado pelo comprimento do dia. O crescimento foi menor em dias curtos (8h) em todas as medidas de crescimento feitas, ou seja, número de pares de folhas, número de brotações e comprimento de haste. As plantas submetidas a fotoperíodo de duração intermediária (12h) apresentaram maiores valores de comprimento de haste e número de pares de folha. O maior

número de brotações, no entanto, foi observado em dias longos (16h). O acúmulo de massa fresca e seca do órgão subterrâneo, assim como o teor de frutose foi maior em dias longos. O conhecimento do crescimento das plantas aclimatizadas sob condições fotoperiódicas controladas também trouxe informações importantes para a eventual produção de plantas em escala comercial. Considerando que o crescimento é favorecido por fotoperíodos de 12h, que é a condição mais comumente encontrada no país ao longo do ano, a produção de plantas não acarretará ao produtor um gasto extra em termos de energia elétrica. Esta eventualmente poderá vir a ser necessária na etapa de indução floral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTAMURA, M.M. Root histogenesis in herbaceous and woody explants cultured *in vitro*. A critical review. **Agronomie**, v.16, p.589-602, 1996.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; ESTELITA, M.E.M. Caracteres anatômicos da propagação vegetativa de *Mandevilla illustres* (Vell.) Woodson e de *M. velutina* (Mart. ex-Stadelm.) Woodson - Apocynaceae. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, 9., local, 1995. **Anais...** local: SBSP, 1995. p.5-13.

CARVALHO, M.A.M.; DIETRICH, S.M.C. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. **New Phytologist**, v.123, p.735-740, 1993.

CARVALHO, M.A.M.; ZAIDAN, L.B.P.; DIETRICH, S.M.C. Growth and fructan content of plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rhizophores. **New Phytologist**, v.136, p.153-161, 1997.

CESARINO, F. Crescimento de *Vernonia cognata* Less.; uma espécie herbácea de cerrado. Campinas, 1996. 76p. (Dissertação) Mestrado - Universidade Estadual de Campinas.

- CHAVES, L.J. & NAVES, O cerrado do Brasil: uma fonte potencial de recursos genéticos. 1998, p.74-86 (Palestra).
- COUTINHO, L.M. Aspectos ecológicos do fogo no cerrado. II. As queimadas e a dispersão de sementes em algumas espécies anemocóricas do estrato herbáceo subarbustivo. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v.5, p.57-64, 1977.
- COUTINHO, L.M.; VUONO, Y.S.; LOUSA, J.S. Aspectos ecológicos do fogo no cerrado. IV. a época da queimada e a produtividade primária líquida epigéia do estrato herbáceo subarbustivo. **Revista Brasileira de Botânica**, v.5, p.37-41, 1982.
- DAVIES, Jr. F.T.; LAZARTE, J.E.; JOINER, J.N. Initiation and development of roots in juvenile and mature leaf bud cuttings of *Ficus pumila* L. **American Journal of Botany**, v.69, n.5, p.804-811, 1982.
- DE KLERK, G.J.; KEPPEL, M.; TER BRUGGE, J.; MEEKES, H. Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings. **Journal of Experimental Botany**, v.46, n.289, p.965-972, 1995.
- DIETRICH, S.M.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Organos subterraneos y propagación vegetativa en plantas de los cerrados brasileiros. **Medio Ambiente**, v.7, p.45-52, 1985.
- DOP, P.; GAUTIÉ, A. Manual de Technique Botanique. 2ed. Paris: J. Lamarre, XXII. 1928. 594p.

EDELMAN, J.; JEFFORD, T.G. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. **New Phytologist**, v.67, p.517-531, 1968.

ESAU, K. **Anatomy of seed plants**. New York: John Wiley & Sons, 1977. 550p.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; DIETRICH, S.M.C. Variações estacionais nos compostos de reserva e no metabolismo do xilopódio de *Ocimum nudicaule* Benth. var. *anisifolia* giul. (Labiatae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.4, p.73-82, 1981.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; DIETRICH, S.M.C.; CHU, E.P.; MACHADO DE CARVALHO, M.A.; VIEIRA, C.C.J.; GRAZIANO, T.T. Reserve carbohydrates in underground organs of native brazilian plants. **Revista Brasileira de Botânica**, v.9, p.159-166, 1986.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; DIETRICH, S.M.C.; CHU, E.P.; MACHADO DE CARVALHO, M.A.; VIEIRA, C.C.J.; GRAZIANO, T.T. Reserve carbohydrates in underground organs of native brazilian plants. **Revista Brasileira de Botânica**, v.9, p.,159-166, 1986.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Distribuição, aspectos estruturais e funcionais dos frutanos, com ênfase em plantas herbáceas do cerrado. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.5, n.2, p.203-208, 1993.

FRIEDMAN, R.; ALTMAN, A.; ZAMSKI, E. Adventitious root formation in bean hypocotyl cuttings in relation to IAA translocation and hypocotyl anatomy. **Journal of the Experimental Botany**, v.30, p.769-777, 1979.

- GASPAR, T. Rooting and flowering, two antagonistic phenomena from a hormonal point of view. In: JEFFCOAT, B. (Ed.) **Aspects and prospects of plant growth group regulators**. Wantage: British Plant Growth Group, p.39-49, 1981.
- GONÇALVES, J.C.; DIOGO, G.; AMÂNCIO, S. *In vitro* propagation of chestnut (*Castanea sativa* x *C. crenata*): Effect of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. **Scientia Horticulturae**, v.72, p.265-275, 1998.
- GROUT, B.W.W.; ASTON, M.J. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. **Horticulture Research**, v.17, p.1-7, 1977.
- HARTMAN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, J.T. **Plant Propagation**. Principles and Practices. 5.ed., Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1990. p.204-205.
- HENDRY, G.A. F. The ecological significance of fructan in a contemporary flora. **New Phytologist**, v.106, p.201-216, 1987.
- HENDRY, G.A. F. Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biographic, and mechanistic appraisal. **New Phytologist**, v.123, p.3-14, 1993.
- HILAIRE, R.S.; BERWART, C.A.F.; PÉREZ-MUÑOZ, C.A. Adventitious root formation and development in cuttings of *Mussaeda erythrophylla* L. Schum & Thorn. **Hortscience**, v.31, n.6, p.1023-1025, 1996.

- HOEHNE, F.C. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. Departamento de Botânica do Estado de São Paulo, São Paulo, 1939.
- ISEJIMA, E.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Fructan variations in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae): the influence of phenology. **Plant Cell Physiology**, v.34, p.723-727, 1991.
- ISEJIMA, E.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; ZAIDAN, L.B.P. Fructan composition in adventitious tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae) as influenced by daylength. **New Phytologist**, v.119, p.149-154, 1991.
- JERMYN, M.A. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. **Nature**, v.177, p.38-39, 1956.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for a use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.27, p.137-138, 1965.
- KICKS, G.S. Adventitious rooting of apple microcuttings *in vitro*: an anatomical study. **Canadian Journal of Botany**, v.65, p.1913-1920, 1987.
- KLEIN, A.L.; ZAIDAN, B.P.; FELIPPE, G.M. Interaction between soil and photoperiod on development of *Bidens gardneri* Baker (Asteraceae), a herbaceous species from the Brazilian cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v.19, n.1, p.1-15, 1996.
- LABORIAU, L.G. Problemas da fisiologia ecológica vegetal no cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.38, p.5-38, 1971.

- LOVELL, P.H.; WHITE, J. Anatomical changes during adventitious root formation. In: JACKSON, M.B. (Ed.) **New root formation in plants and cuttings**. Martinus Nijhoff, Dordrecht. The Netherlands, 1986. p.111-140.
- MANTOVANI, W.; MARTINS, F.R. Variações fenológicas das espécies de cerrado da reserva Biológica de Mogi-Guaçu, São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v.11, p.101-112, 1988.
- MERCIER, H.; VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a brazilian medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.28, p.249-254, 1992.
- MERCIER, H.; VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a brazilian medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.28, p.249-254, 1992.
- MOREIRA, M.F.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; Z Aidan, L.B.P. Estudos anatômicos do enraizamento *in vitro* de explantes caulinares de *Gomphrena macrocephala* St. Hill. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 49., Salvador, 1997. **Resumos...** Salvador: Universidade Federal da Bahia, 1998. p.464.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

N.A.S. Underexploited Tropical Plants with Promising economic value, National Academy of Sciences, 1978. Washington, D.C.

PALMER, J. A taxonomic revision of *Gomphrena* (amaranthaceae) in Australia. **Australian Systematic Botany**, v.11, p.73-161, 1998.

PLÜSS, R.; SCHMID, A. The anatomy of adventitious root formation in greenwood cuttings of *Populus tremula* L. **Bot. Helv.**, v.98, p.97-102, 1988.

POLLOCK, C.J.; CHATTERTON, N.J. Fructan. In: PREISS, J. (Ed.) **Biochemistry of plants**. London: academic Press, 1988. v.14, p.109-140.

POLLOCK, C.J.; JONES, T. Seasonal patterns of fructan metabolism in forage grasses. **New Phytologist**, v.83, p.8-15, 1979.

PONTIS, H.G. Fructans and cold stress. **Journal of Plant Physiology**, v.134, p.148-150, 1989.

RANZANI, G. Solos do cerrado do Brasil. In: FERRI, M.G. (Ed.) **Simpósio sobre o Cerrado**, São Paulo: E. Blucker & EDUSP, 1971. p.26-43.

RIZZINI, C.T. Aspectos ecológicos da regeneração em algumas plantas do cerrado. In: FERRI, M.G. (Ed.) **Simpósio sobre o Cerrado**, São Paulo: E. Blucker & EDUSP, 1971. p.61.

RIZZINI, C.T. **Tratado de fitogeografia do Brasil**. São Paulo: EDUSP, vol. 1, 1976.

RIZZINI, C.T.; HERINGER, E.P. Estudos sobre os sistemas subterrâneos difusos de plantas campestres. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.38, p.85-112, 1966.

SAKAY, W.S. Simple method for differential staining of parafilm embeded plant material using toluidine blue 01. **Stain Technology**, v.48, p.247-249, 1975.

SAN-JOSÉ, M.C.; VIDAL, N.; BALLESTER, A. Anatomical and biochemical changes during root formation in oak and apple shoots cultured *in vitro*. **Agronomie**, v.12, p.767-774, 1992.

SHIOMI, N.; ONODERA, S.; VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Structure of fructan polymers from tuberous roots of *Gomphrena macrocephala* st.-Hil., a herbaceous amaranthaceae from the cerrado. **New Phytologist**, v.133, 1996.

SHIOMI, N.; ONODERA, S.; VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Structure of fructan polymers from tuberous roots of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil., a herbaceous Amaranthaceae from the cerrado. **New Phytologist**, v.133, p.643-650, 1996.

SIQUEIRA, J.C. Contribuição ao conhecimento taxonômico das espécies do gênero *Gomphrena* L. (Amaranthaceae) que ocorrem nas regiões sudeste e centro-oeste do Brasil. **Pesquisas (Botânica)**, v.37, p.1-111, 1985.

SIQUEIRA, J.C. Importância alimentícia e medicinal das Amarantáceas do Brasil. **Acta Biológica Leopold**, v.9, p.99-110, 1987.

- SIQUEIRA, J.C. Importância alimentícia e medicinal das Amarantáceas do Brasil. **Acta Biológica Leopold**, v.9, p.99-110, 1987.
- SIQUEIRA, J.C. O gênero *Gomphrena* L. (Amaranthaceae) no Brasil. Campinas, 1991. 273p. (Tese) Doutorado - Universidade Estadual de Campinas.
- SMA (Secretaria do Meio Ambiente). Cerrado: Bases para conservação e uso sustentável das áreas de cerrado do Estado de São Paulo. Série PROBIO/SP São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 1997. 113p.
- TEIXEIRA, P.G.; CARVALHO, M.A.M.; ZAIDAN, L.B.P.; KLEIN, A.L. Effect on mineral nutrients on growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, n.2, p.89-96, 1997.
- THOMAS, B.; VINCE-PRUE, D. Photoperiodism in plants. San Diego: Academic Press, 2.ed. 1997. 428p.
- VIANELLO, R.L.; ALVES, A.R. Meteorologia básica e aplicações. Imprensa Universitária, 1991.
- VIEIRA, C.C.J. Flutuações sazonais e caracterização parcial dos carboidratos solúveis do órgão subterrâneo de *Gomphrena officinalis* Mart. (Amaranthaceae). São Paulo, 1991. 120p. (Dissertação) Mestrado - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

- VIEIRA, C.C.J. Flutuações sazonais e caracterização parcial dos carboidratos solúveis do órgão subterrâneo de *Gomphrena officinalis* Mart. (Amaranthaceae). São Paulo, 1991. 120p. (Dissertação) Mestrado - Universidade de São Paulo.
- VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Fructose - containing carbohydrates in the tuberous root of *Gomphrena macrocephala* St. Hil. (Amaranthaceae) at different phenological phases. **Plant, Cell Environment**, v.16, p.919-928, 1993.
- VIEIRA, C.C.J.; MERCIER, H.; CHU, E.P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. *Gomphrena* species (globe amaranth): *In vitro* culture and production of secondary metabolites. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Springer-Verlag, Berlin & Heidelberg, v.28, p.257-270, 1994.
- VIEIRA, Caracterização e produção de frutanos por tecidos e órgãos isolados de *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. (Amaranthaceae). São Paulo, 1996. 160p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- YAMAMOTO, M.; KAWANO, T.; YOUNG, M.C.M.; CHU, E.P.; HARAGUCHI, M.; HIROKI, K. Molluscicidal activity of three Brazilian plant species. **Fitoterapia**, v.LXXII, n.1, p.59-62, 1996.
- YAMAMOTO, S.; MINO, Y. Partial purification and properties of phleinandase induced in stem base of orchardgrass after defoliation. **Plant Physiology**, v.78, p.591-595, 1995.

- YOUNG, M.C.M.; POTOMATI, A.; CHU, E.P.; HARAGUCHI, M.; YAMAMOTO, M.; KAWANO, T. ^{13}C NMR analysis of monodesmosidic saponins from *Gomphrena macrocephala*. **Phytochemistry**, v.46, n.7, p.1267-1270, 1997.
- YOUNG, M.C.M.; VIEIRA, C.C.I.; CHU, E.P.; HARAGUCHI, M.; YAMAMOTO, M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Ecdysterone and saponins from tuberous roots of *Gomphrena officinalis* Mart. (Amaranthaceae). **Revista Lationamericana de Química**, 22/4 & 23/1, p.41-44, 1992.
- ZAIDAN, L.B.P.; FELIPPE, G.N. Flowering of cerrado plants: experiments in semi-controlled environmental conditions. **Flowerings Newsletter**, v.18, p.4-11, 1994.