

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae).

Patrícia Silva Flores
Engenheira Agrônoma

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Enio Luiz Pedrotti
Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Alves

Florianópolis, SC
2003

FICHA CATALOGRÁFICA

Flores, Patricia Silva

Propagação *in vitro* e *in vivo* de *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae)./Patricia Silva Flores. Florianópolis, 2003.

137 f. : il., tabs.

Orientador: Enio Luiz Pedrotti

Co-orientador: Antônio Carlos Alves

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias.

1. Propagação – *Hippeastrum aulicum*. 2. germinação, 3. estaquia, 4. Cultura de tecidos

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus.

Aos meus pais, Nélio Flores e Sonia Lofrides Silva Flores pelo apoio moral e muitas vezes material. À minha irmã e grande amiga Andréia Silva Flores pelas inúmeras vezes em que me auxiliou durante a elaboração desta dissertação.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Antônio Carlos Alves e Prof. Dr. Enio Luiz Pedrotti pela oportunidade, orientação e paciência.

À Profa. Dra. Maike Hering pela sugestão da espécie estudada. À Profa. Marisa Santos pela orientação nos estudos histológicos. Ao Prof. Dr. Marcelo Maraschin pelo auxílio na análise dos ácidos fenólicos. À Profa. Julie Duthil pela ajuda.

Aos colegas da turma de Mestrado nos quais me sustentei para superar as adversidades do curso. Em especial a Josiane Arsego pela amizade e auxílio no fornecimento de bibliografias e durante a análise de ácidos fenólicos, e a Seidel Ferreira pela ajuda na confecção das lâminas durante os estudos histológicos. Ao amigo Luis Pacheco pelas palavras de carinho e apoio. Aos colegas do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica vegetal; Rudinei Exterkoter e Denílson Dortzbach pela ajuda.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo durante o curso. E por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para execução desta etapa tão importante da minha vida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
CAPÍTULO 1 – GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Hippeastrum aulicum</i> (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae).	
1. RESUMO.....	13
2. ABSTRACT.....	14
3. INTRODUÇÃO.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
6. CONCLUSÕES.....	25
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
CAPÍTULO 2 – PROPAGAÇÃO DE <i>Hippeastrum aulicum</i> (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae) ATRAVÉS DE BAINHAS FOLIARES.	
1. RESUMO.....	29
2. ABSTRACT.....	30
3. INTRODUÇÃO.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÕES.....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

CAPÍTULO 3 – MICROPROPAGAÇÃO DE *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae).

1. RESUMO.....	45
2. ABSTRACT.....	46
3. INTRODUÇÃO.....	47
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.1. Material Vegetal.....	52
4.2. Obtenção e assepsia dos explantes de partes florais.....	52
4.3. Obtenção, assepsia e viabilidade dos explantes de camadas de bainhas foliares.....	54
4.3.1. Delineamento experimental e avaliações	56
4.4. Indução e multiplicação de brotações em explantes de bainhas foliares de <i>Hippeastrum aulicum</i> micropropagadas.....	56
4.4.1. Indução de brotações sobre os explantes primários.....	56
4.4.2. Multiplicação das brotações	57
4.4.3. Delineamento experimental e avaliações.....	58
4.5. Análise de compostos fenólicos formados nos explantes de ovário e de bainhas foliares de <i>Hippeastrum aulicum</i> , durante a propagação <i>in vitro</i>	58
4.5.1. Coleta de amostras e extração dos compostos fenólicos.....	59
4.5.2. Análise de ácidos fenólicos	59
4.6. Análises histológicas.....	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1. Assepsia e viabilidade dos explantes de bainha foliar de <i>Hippeastrum aulicum</i>	62
5.2. Indução e multiplicação de brotações em explantes de bainhas foliares de <i>Hippeastrum aulicum</i> micropropagadas.....	65
5.3. Análise de compostos fenólicos formados nos explantes de ovário e de bainhas foliares de <i>Hippeastrum aulicum</i> , durante a propagação <i>in vitro</i>	74
5.4. Análises histológicas.....	79
6. CONCLUSÕES.....	91
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

CAPÍTULO 4 – INDUÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS DE EMBRIÕES IMATUROS E EM SEGMENTOS DE PLÂNTULAS DE *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae), *In Vitro*

1. RESUMO.....	99
2. ABSTRACT.....	100
3. INTRODUÇÃO.....	101
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	104
4.1. Material Vegetal.....	104
4.1.2. Embriões imaturos.....	104
4.1.3. Segmentos de plântulas.....	105
4.2. Indução de calos.....	105
4.3. Delineamento experimental e avaliações.....	105
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	107
5.1. Indução de calos em embriões imaturos.....	107
5.2. Indução de calos em segmentos de plântulas.....	113
6. CONCLUSÕES.....	115
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	120
ANEXOS.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4 - D-ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético

ABA - Ácido abcísico

AIB - Ácido indol-3-butírico

ANA - Ácido naftaleno acético

BAP - 6 - Benzilaminopurina (6-Benzilamina)

CCA - Centro de Ciências Agrárias

CLAE - Cromatografia Líquida de alta eficiência

CV - Coeficiente de variação

KIN - 6-furfurilaminopurina (Cinetina)

LS - Meio básico de Linsmaier & Skoog (1965)

MS - Meio básico de Murashige & Skoog (1962)

UCAD - Unidade de Conservação Desterro

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

RESUMO

FLORES, Patrícia Silva. Propagação *in vitro* e *in vivo* de *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb (Amaryllidaceae). 2003. 137 f.. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

O Brasil é um país rico em espécies de plantas nativas com potencial ornamental. No entanto, o pouco conhecimento das espécies e a falta de um sistema de propagação adequado têm limitado a utilização das mesmas na floricultura. *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb (Amaryllidaceae) é uma espécie nativa da Mata Atlântica, cujo valor comercial é reconhecido em outros países, mas é praticamente desconhecido no Brasil. Não foram encontrados trabalhos sobre a propagação da espécie, no entanto, em casa de vegetação, observou-se que são produzidos poucos bulbos por planta, inviabilizando a multiplicação natural como método de propagação em escala comercial. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo analisar metodologias para a propagação da espécie *Hippeastrum aulicum*, através da germinação das sementes, estaquia de bainhas foliares, micropropagação de segmentos de partes florais e de bainhas foliares e indução de calos em embriões imaturos e em segmentos de plântulas *in vitro*. Os resultados destes estudos indicaram que as sementes de *H. aulicum* possuem elevado potencial germinativo, atingindo 100% de sementes germinadas, quando semeadas em ambiente com ausência de luz e em temperaturas de 25-35 °C. Na estaquia de bainhas foliares verificou-se que não é necessária a utilização de ANA ou AIB para o enraizamento das mesmas e as estacas retiradas da região central do bulbo são mais indicadas como material para estaquia. Explantes de dupla camada de bainhas foliares foram mais adequados que explantes de partes florais para a micropropagação devido à elevada oxidação *in vitro* dos últimos. Com a utilização de 1 µM ANA e 4µM BAP foram obtidos os melhores resultados para indução de brotações e bulbos nos explantes de bainhas foliares. Com a utilização de 4 µM ou 10 µM de 2,4-D e explantes de seções proximais de sementes com embriões com menos de 1 mm de comprimento foram obtidas as maiores porcentagens de embriões com calos friáveis.

ABSTRACT

FLORES, Patrícia Silva. *In vitro* and *in vivo* propagation of *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae). 2003. 137 f.. Dissertation (Master in Vegetable Genetical Resources) – Post Graduation Program in Vegetable Genetical Resources, Agrarian Sciences Center. Federal University of Santa Catarina State, Florianópolis City.

Brazil is a rich country in native plant species with an ornamental potential. However, the little knowledge about the species and the lack of a suitable propagation system has limited its use in floriculture. *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae) is a native species from Atlantic Forest whose commercial value is recognized in other countries, but it is practically unknown in Brazil. Studies about species propagation were not found, however, in greenhouse, it has been found that few bulbs per plant are produced, making unpracticable the natural multiplication as a propagation method in commercial scale. In this context, this study had as purpose to analyze methodologies for propagation of *Hippeastrum aulicum* specie through seed germination, bulb scales cuttings, micropropagation of floral part segments and bulb scales and callus induction in immature embryos and in plantlets segments *in vitro*. Results of these studies indicated that the seeds of *H. aulicum* have a high germinative potential, reaching 100% of germination when they were sowed in absence of light and at temperatures ranging from 25 °C to 35 °C. For bulb scales cutting it was verified that it is not necessary the utilization of neither ANA nor AIB for the rooting and the scales withdraw from central area of the bulb was the most indicated as material for bulb scale cutting. Twin-scalin explants were most suitable for micropropagation than floral parts explants due to the high *in vitro* oxidation of the last ones. With the utilization of 1 µM ANA and 4 µM BAP the best results were obtained for callus and bulbs induction with bulb scale explants. With the utilization of 4 µM or 10 µM of 2,4-D and proximal segments of embryo explant with embryonic axis with less than 1 mm length has reached the greater percentages of embryos with friable callus.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Aspectos da fenologia e morfologia de <i>Hippeastrum aulicum</i> . (A) Florescimento no seu habitat natural; (B) produção de bulbos; (C) fruto maduro com sementes.	6
Figura 2	Porcentagem de germinação de sementes de <i>Hippeastrum aulicum</i> em diferentes temperaturas e condições de luminosidade.	20
Figura3	Seqüência do processo germinativo de sementes de <i>H. aulicum</i> : A – crescimento do embrião; B – entumescimento do hipocótilo; C – formação de raiz contráctil na base do pró-bulbo; D - plântula obtida de germinação de sementes na ausência de luz; E - plântula obtida da germinação de sementes sob luz constante.	22
Figura 4	Velocidade de germinação (IVG) de sementes de <i>H. aulicum</i> em diferentes temperaturas e luminosidade.	23
Figura 5	Esquema utilizado para a obtenção de estacas de dupla camada de bainha foliar de <i>Hippeastrum aulicum</i> : A – O bulbo foi cortado transversalmente e a parte superior foi eliminada; B – A parte inferior foi seccionada radialmente em fatias, C – Cada fatia foi separada em segmentos de dupla camada de bainha foliar, inseridas em uma porção do caule.	34
Figura 6	Estacas de bainha foliar de <i>H. aulicum</i> , 40 dias após a transferência para substrato, em fitotrom a temperatura de 25 °C, em ausência de luz: (A) Estaca tratada com 500 ppm de ANA; (B) Estaca sem a utilização de auxina.	37

- Figura 7 Estacas de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum* provenientes da região central (I) e da região periférica (II) do bulbo, tratadas com 500 ppm de ANA (A) e sem a utilização de ANA (B), 40 dias após a transferência para substrato, em fitotrom a temperatura de 25 °C, em ausência de luz. 39
- Figura 8 Esquema utilizado para a obtenção de explantes de dupla camada de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*: A – O bulbo foi cortado transversalmente e a parte superior foi eliminada; B – A parte inferior foi seccionada radialmente em fatias, C – Cada fatia foi separada em segmentos de dupla camada de bainha foliar, inseridas em uma porção do caule. 54
- Figura 9 Padrões de viabilidade de tecidos de bainhas foliares de *H. aulicum*, após 12 horas em solução de brometo de tetrazólio: A – Tecidos provenientes de explantes mantidos por 90 dias em meio de cultura MS e que não diferenciaram; B – Tecidos viáveis provenientes do bulbo intacto. 62
- Figura 10 Explante de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum* inoculado em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962), suplementado com 1,0 µM de ANA e 4,0 µM de BAP: A) Espessamento dos tecidos próximos à superfície abaxial das bainhas foliares aos 60 dias da inoculação; B) Produção de calos aos 90 dias da inoculação. 65
- Figura 11 Porcentagem de explantes de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum* com calos, aos 90, 120, 150 e 210 dias, em meio MS com diferentes concentrações da ANA e BAP. Médias com a mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste DMS, quando comparados os tratamentos por período de avaliação. 66

- Figura 12 Morfogênese *in vitro* de explantes de bainhas foliares de *H. aulicum* em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) suplementado com 1,0 μM de ANA e 4,0 μM de BAP: A – Detalhe da formação de brotações a partir dos calos; B – Detalhe da formação de bulbos nas bases das brotações. 67
- Figura 13 Número de brotações produzidas por explante de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, aos 90, 120, 150 e 210 dias, em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP. Médias com a mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste DMS, quando comparados os tratamentos por período de avaliação. 68
- Figura 14 Número de bulbos produzidos por explante de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, aos 90, 120, 150 e 210 dias, em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP. Médias com a mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste DMS, quando comparados os tratamentos por período de avaliação. 68
- Figura 15 Número de raízes produzidas por explante de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, aos 90, 120, 150 e 210 dias, em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP. Médias com a mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste DMS, quando comparados os tratamentos por período de avaliação. 69
- Figura 16 Detalhe da formação de bulbos em explantes de bainhas foliares de *Hippeastrum aulicum* com a utilização de meio MS suplementado com 1,0 μM de ANA e 0,2 μM de BAP (A) e 1,0 μM de ANA e 4,0 μM de BAP (B). 70

- Figura 17 Número de brotações, bulbos e raízes por explante de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, após 60 dias da transferência de meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP para meio MS com 1,0 µM de ANA e 4,0 µM de BAP. Médias com a mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste DMS, quando comparados os tratamentos por período de avaliação. 71
- Figura 18 Cromatograma de extratos de tecidos de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum* com coloração natural, registrados à 280 nm. 76
- Figura 19 Cromatograma de extratos de tecidos de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum* cultivados em meio MS suplementado com 1 µM de ANA e 4 µM de BAP, após 30 dias da detecção visual de pigmentação violácea nos tecidos, registrados à 280 nm. 76
- Figura 20 Cromatograma de extratos de tecidos de ovário de *Hippeastrum aulicum* cultivados em meio MS, após 30 dias da detecção visual de pigmentação violácea nos tecidos, registrados à 280 nm. 77
- Figura 21 Secção transverso-longitudinal de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, aos 40 dias da inoculação em meio MS suplementado com ANA e BAP. Legenda: a=grãos de amido; ab=superfície abaxial; ep=epiderme; f=floema; p=parênquima; x=xilema. 79
- Figura 22 Detalhe dos grãos de amido no interior das células do parênquima do mesofilo da bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, antes da inoculação em meio de cultura. 80

- Figura 23 Detalhe do mesofilo de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, antes da inoculação em meio de cultura. Legenda: a=grãos de amido; cs = canal secretor; fx=feixe vascular; p=parênquima. 80
- Figura 24 Secção transverso-longitudinal de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, aos 45 dias da inoculação em meio MS, suplementado com ANA e BAP, destacando os tecidos formadores do calo. A – Tecido meristemático; B - detalhe dos tecidos periféricos do calo; C - detalhe das células do parênquima meristemático. Legenda: ab=superfície abaxial, n=núcleo, pm=parênquima meristemático. 82
- Figura 25 Secção transverso-longitudinal de bainha foliar de *H. aulicum*, aos 60 dias da inoculação, em meio MS suplementado com ANA e BAP. A – Vista geral da bainha, com presença de calo desenvolvido e constituído por tecidos meristemáticos. B – Detalhe da região periférica do calo. Legenda: a = grãos de amido; ab = superfície abaxial; mi= meristema interno; mp= meristema periférico; n = núcleo; p = parênquima; pm= parênquima meristemático. 84
- Figura 26 Secção transverso-longitudinal de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, aos 90 dias da inoculação em meio MS, suplementado com ANA e BAP, evidenciando os calos, inicial e secundários, formados na superfície abaxial. Legenda: a = grãos de amido; ab = superfície abaxial; cf = compostos fenólicos; ci = calo inicial; cs = calos secundários; f = floema; p = parênquima; x = xilema. 86

- Figura 27 Secção transverso-longitudinal de bainha foliar de *H. aulicum*, aos 90 dias da inoculação em meio MS, suplementado com ANA e BAP. A – Aspecto geral do calo na face abaxial da bainha; B – detalhe da região de transição entre o calo inicial e os secundários, evidenciando o acúmulo de prováveis compostos fenólicos. Legenda: a=grãos de amido; ab=superfície abaxial; cf=compostos fenólicos; ci=calo inicial; cs=calos secundários; p=parênquima. 88
- Figura 28 Frutos imaturos de *H. aulicum*: com 4,4 cm (A) e 3,7 cm (B) de diâmetro. 104
- Figura 29 Formação de calos sobre a radícula de embriões imaturos de *H. aulicum* com eixo embrionário com menos de 1mm de comprimento, aos 60 dias de cultura em meio Murashige & Skoog (1962) com 4 µM de 2,4-D. 111
- Figura 30 Embriões de *H. aulicum* em meio Murashige & Skoog (1962) com 4 µM de 2,4 – D: A)Calos obtidos em embriões com menos de 1mm de comprimento do eixo embrionário, aos 60 dias, B) e aos 90 dias da inoculação; C) Emissão da radícula de embriões com 4 mm de comprimento de eixo embrionário, aos 60 dias, D) Formação de calos aos 90 dias da inoculação em meio de cultura. 111
- Figura 31 Produção de calos em segmentos proximais de bulbos de plântulas obtidas de embriões imaturos de *H. aulicum* (com eixo embrionário medindo 4 mm e menos de 1 mm), após 90 dias em meio de cultura de Murashige & Skoog (1962), suplementado com 4 µM de 2,4-D. Legenda: r=raiz; b=bulbo; c=calo. 113

Figura 32 Produção de calos em segmentos proximais de bulbos de plântulas obtidas de embriões imaturos de *H. aulicum* (com eixo embrionário medindo 4 mm e menos de 1 mm), após 90 dias de cultura em meio Murashige & Skoog (1962), suplementado com 4 μ M de 2,4-D. Legenda: r=raiz; b=bulbo; c=calo. 114

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Porcentagem da germinação de sementes de <i>Hippeastrum aulicum</i> em diferentes temperaturas e condições de luminosidade, após 13 dias da semeadura.	21
Tabela 2	Sobrevivência das estacas, porcentagem de enraizamento, número de raízes, porcentagem de bulbificação e número de bulbos por estaca de bainhas foliares de <i>Hippeastrum aulicum</i> provenientes da região periférica (P) e central (C) do bulbo, após 40 dias do plantio, quando tratadas com diferentes concentrações de ANA e AIB.	36
Tabela 3	Composição (mg.L^{-1}) do meio de cultura de Murashige & Skoog (1962).	53
Tabela 4	Concentrações (μM) de ANA e de BAP utilizadas em meio de cultura MS para indução de gemas vegetativas em explantes de bainhas foliares de <i>Hippeastrum aulicum</i> .	57
Tabela 5	Porcentagem de sobrevivência de explantes de <i>H. aulicum</i> , após 90 dias da inoculação em meio MS.	63
Tabela 6	Número de brotações, bulbos e raízes por explante de bainha foliar de <i>Hippeastrum aulicum</i> , após 30, 60 e 90 dias em meio MS, suplementado com $1 \mu\text{M}$ de ANA e diferentes concentrações de BAP.	72
Tabela 7	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de ácidos fenólicos em amostras de tecidos de bainha foliar de um bulbo intacto e em amostras de bainha foliar e de ovário de <i>Hippeastrum aulicum</i> , após 30 dias da formação de pigmentação violácea <i>in vitro</i> , determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).	74

Tabela 8	Porcentagem de embriões imaturos de <i>H. aulicum</i> que apresentaram emissão da radícula em função da concentração de 2,4-D e do período de cultura em meio Murashige & Skoog (1962).	108
Tabela 9	Porcentagem de embriões imaturos de <i>H. aulicum</i> que produziram calos em função das concentrações de 2,4 –D e do período de cultura em meio Murashige & Skoog (1962).	109
Tabela 10	Porcentagem de calos com raízes e porcentagem de calos com produção de bulbos, aos 90 e aos 120 dias da inoculação de embriões de <i>Hippeastrum aulicum</i> , com eixo embrionário medindo menos de 1mm de comprimento, em meio de cultura Murashige & Skoog (1962) com diferentes concentrações de 2,4-D.	112
Tabela 11	Porcentagem de explantes de segmentos de bulbo (metade proximal) de <i>Hippeastrum aulicum</i> que produziram calos, após 90 dias de cultura em meio de cultura MS com diferentes concentrações de 2,4-D.	114

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui a maior diversidade genética vegetal do planeta (IBAMA, 2002). Além da Amazônia, que destaca-se por concentrar a maior diversidade biológica do país, a Mata Atlântica e o Pantanal também apresentam uma exuberante multiplicidade de espécies. Esse patrimônio genético vem sendo explorado há algumas décadas por organismos internacionais representados principalmente pela indústria farmacêutica e pelo comércio internacional de plantas ornamentais (IBAMA, 2002). Dentre as plantas nativas que possuem valor ornamental reconhecido e são amplamente comercializadas no mercado internacional de plantas ornamentais, destacam-se as orquídeas, bromélias, cactos e plantas do cerrado (IBAMA, 2002).

Os recursos genéticos vegetais brasileiros não são valorizados em nível nacional (CHAMAS & MATHES, 2000). O número de plantas nativas comercializadas é pouco representativo diante da diversidade existente (CHAMAS & MATHES, 2000). Segundo Mello Filho (1995), existem entre 5.000 e 6.000 espécies arbóreas nativas que poderiam ser utilizadas na ornamentação de parques e na arborização urbana. Porém, observa-se no paisagismo brasileiro a utilização exaustiva de um grande número de plantas exóticas, muitas delas inadequadas às condições do meio, além de serem pouco atrativas à fauna.

Além do fator cultural, o desconhecimento das espécies nativas talvez consista na base da questão da falta da exploração comercial destas plantas (JAMIESON, 1986). De acordo com IBAMA (2002), de um total estimado entre 350 e 550 mil espécies de plantas existentes no país, apenas 55 mil estão catalogadas. Destas, 107 fazem parte da lista oficial de espécies de plantas brasileiras ameaçadas de extinção.

A falta de oferta de mudas no mercado é outro importante fator limitante ao uso de plantas nativas na floricultura. A exemplo de algumas espécies de bromélias e orquídeas, que são plantas conhecidas e comercializadas, a falta de um sistema de cultivo eficiente tem levado à sua extração desordenada e ilegal na mata. A deficiência na oferta de mudas é, em parte, conseqüência da falta de informação sobre aspectos básicos relacionados ao cultivo das espécies. No Brasil, existem poucas informações publicadas a esse respeito. Na grande maioria dos casos, os

viveiristas utilizam informações por eles geradas, porém sem embasamento científico além de não divulgarem a metodologia que desenvolveram.

Tendo em vista que considerável parcela dos três bilhões de dólares anuais movimentados com o comércio internacional de plantas ornamentais é resultante da comercialização de espécies tropicais (INFORMATIVO IBRAFLOR, 2001), o cultivo de espécies nativas ornamentais tem despertado crescente interesse no Brasil. O cultivo de espécies nativas pode representar um considerável aumento dos atuais 0,2% da participação brasileira no comércio mundial de plantas ornamentais (INFORMATIVO SECEX, 2002). Apenas em flores de corte frescas, estima-se que as flores tropicais respondam por aproximadamente 3% do comércio mundial (INFORMATIVO IBRAFLOR, 2001).

Além da importância da exploração de espécies nativas para a economia, ao gerar divisas para o país, a utilização de espécies nativas na ornamentação de ambientes também é de grande importância do ponto de vista conservacionista. O estímulo ao uso de elementos da flora nativa em projetos paisagísticos oportuniza a conscientização do valor dos recursos genéticos vegetais no país e da necessidade de conservá-los, permitindo assim sua exploração racional e sustentável, auxiliando na sua preservação.

O Estado de Santa Catarina se destaca por constituir uma das áreas de abrangência da Mata Atlântica. Este bioma é rico em espécies com potencial ornamental e está em risco de extinção. O Estado de Santa Catarina é o 4º produtor nacional de plantas ornamentais (EPAGRI, 2003), onde a floricultura está consolidada como uma atividade de importância sócio-econômica como fonte geradora de empregos para fixar o homem ao campo, sobretudo em pequenas propriedades. Em 1995, haviam 115 produtores de plantas ornamentais em Santa Catarina, com uma média de 2,97 ha plantados por propriedade e em 2002, o número de produtores aumentou para 370 (INFORMATIVO IBRAFLOR, 2001; EPAGRI, 2003). O Estado destaca-se também pelas condições favoráveis do clima, dispensando a necessidade de ambiente protegido para cultivo das plantas em 93% da área cultivada (KÄMPF, 1997).

No Brasil, os bulbos estão em segundo lugar na pauta de exportações de plantas ornamentais representados principalmente por *Gladiolus* (INFORMATIVO SECEX, 2002). Nos países mais desenvolvidos, o cultivo de bulbosas ornamentais tem crescido significativamente nas últimas décadas, devido à variabilidade de

espécies e a sua ampla distribuição mundial, o que possibilita o desenvolvimento de cultivares adaptadas a diferentes climas (DE HERTOIGH & LE NARD, 1993). Segundo De Hertogh et al. (1992), apesar de existir um grande número de espécies de plantas bulbosas que poderiam ser usadas como ornamentais, 90% da produção mundial restringe-se a seis gêneros: *Gladiolus*, *Hyacinthus*, *Íris*, *Lilium*, *Narcissus* e *Tulipa*. O cultivo de plantas destes poucos gêneros é baseado principalmente no seu valor econômico, o que não acompanha a grande diversidade de gêneros existentes a serem explorados.

Com a necessidade constante de diversificação de espécies na floricultura, é óbvio que o comércio mundial não ficará restrito a apenas seis gêneros. Isto gera oportunidades para a divulgação e comercialização de outras espécies dentro da grande diversidade de gêneros existentes, entre eles o gênero *Hippeastrum* (Amaryllidaceae).

Hippeastrum é um dos gêneros de plantas nativas ornamentais explorados nos países do primeiro mundo, mas pouco da sua diversidade genética é representada nos híbridos atuais (MEEROW, 2000). Este gênero é proveniente das Américas Central e do Sul, principalmente Peru e Brasil (DE HERTOIGH & LE NARD, 1993) e possui entre 60 a 70 espécies. Segundo Flory (1977), a maioria destas espécies é endêmica da bacia Amazônica, sendo ali seu centro de dispersão.

O gênero *Hippeastrum* é referido erroneamente como *Amaryllis*. Devido ao grande número de espécies e a alta incidência de sinônimos, ainda não estão claramente definidos os limites entre estes dois gêneros (DUTHIL, 1987). Herbert (1821 apud DUTHIL, 1987), considerando *Amaryllis* como um gênero africano, criou o gênero *Hippeastrum* para designar as espécies americanas. Entretanto, até hoje parece não haver concordância entre os taxonomistas, sendo ainda utilizada a nomenclatura genérica de *Amaryllis* para as espécies americanas (DUTHIL, 1987).

As “açucenas verdadeiras” como são popularmente conhecidas as espécies do gênero *Hippeastrum* (INSTITUTO PLANTARUM, 2002), são plantas bulbosas com flores de cores, formas e tamanhos variados. Além da beleza das flores, as espécies também possuem valor ornamental quando em estágio vegetativo devido à beleza na arquitetura das folhagens (OKUBO, 1993). De modo geral, as plantas se caracterizam por serem muito vigorosas, com folhas túrgidas, canaliculadas, de ápice agudo, com cerca de 50 cm de comprimento por 5 cm de largura (DUTHIL, 1987).

A maioria das espécies do gênero apresenta auto-incompatibilidade (HARDMAN, 1997). De acordo com Duthil (1987), a maioria das espécies do gênero é diplóide com $2n=22$. No entanto, todos os híbridos que existem atualmente são tetraplóides, devido à seleção de progenia tetraplóide, associada com maior tamanho da flor (MEEROW, KANE, BROCHAT, 1992).

Sua beleza foi descoberta pelos europeus há mais de 200 anos, quando iniciaram seu melhoramento genético criando centenas de cultivares comercializados em diversos países, inclusive no Brasil (INSTITUTO PLANTARUM, 2002). Os programas de melhoramento têm se concentrado na introgressão de caracteres morfológicos, de resistência e rusticidade a partir de cruzamentos entre cultivares já conhecidos, o que tem levado a uma grande complexidade de parentescos e diluição das características das espécies componentes originais (MEEROW, 2000).

Vários híbridos e espécies do gênero *Hippeastrum* têm sido comercializados em diversos países, onde são utilizados principalmente como flor de corte ou vaso (DE HERTOOGH & GALLITANO, 2000). No Brasil, *Hippeastrum hybridum* é o mais conhecido comercialmente, sendo que seu cultivo está mais voltado para produção de bulbos, visando principalmente a exportação (75% da produção) para países como a Holanda, México, Chile e Argentina (SCHOENMAKER & GRAZIANO, 1995).

No Brasil, a espécie *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb é pouco divulgada e não possui reconhecimento como ornamental. Dificilmente é encontrada no comércio. Entretanto, países como Holanda e África do Sul vêm desenvolvendo a vários anos, programas de melhoramento com esta espécie (HARDMAN, 1997). Atualmente, já existem híbridos originados do cruzamento de *H. aulicum* com cultivares de outras espécies deste gênero (HARDMAN, 1997).

H. aulicum é uma espécie nativa da Floresta Atlântica Úmida. Sua distribuição vai do Rio Grande do Sul a Minas Gerais, quase sempre na Serra do Mar ou da Mantiqueira, próximo à faixa litorânea e, principalmente, em locais de maior altitude (DUTHIL, 2001; Mensagem pessoal). É encontrada principalmente em clareiras e sobre pedras na mata, o que lhe confere características de rusticidade e a possibilidade de utilização em espaços abertos, o que significa menor custo com instalações para seu cultivo. Apesar de se tratar de uma planta bulbosa, também ocorre como epífita, característica que distingue a espécie das demais deste gênero (DUTHIL, 1987).

H. aulicum possui um bulbo tunicado, consistindo de bases de folhas expandidas que se dispõem em camadas sobre o caule encurtado. As camadas mais antigas se desintegram, formando a túnica que serve para proteção contra danos mecânicos e dessecação do bulbo. A principal função dos tecidos do bulbo é estocar substâncias de reserva e água para o crescimento sazonal e o seu desenvolvimento, e assim permitir a sobrevivência da espécie. Conforme observamos a campo, quando maduro, o bulbo pode apresentar mais de 9 cm de diâmetro.

Esta espécie também se destaca dentro do seu gênero, pela intensidade do vermelho de suas flores e pela presença de um paraperígono muito desenvolvido (DUTHIL, 1987). As flores são vermelho-vivo com faixas verdes que formam a figura de uma estrela no centro da flor (Figura 1 – A) (DUTHIL, 1987). Às vezes, a tépala inferior envolve a base dos filetes e do estilete. Os estames são mais curtos que as tépalas, os filetes são vermelhos e o estigma trífido (DUTHIL, 1987). O escapo apresenta quase sempre duas flores de tubo curto e paraperígono membranoso, bem evidente e de coloração verde. Em alguns casos as extremidades do paraperígono fecham-se deixando apenas uma pequena abertura (DUTHIL, 1987; OKUBO, 1993). Apesar de a espécie caracterizar-se pelo vermelho de suas flores, nas variedades *H. aulicum* var. *platypetala* Lind. e *H. aulicum* var. *glaucophylla* Hook. ocorrem cores e formas diferenciadas.

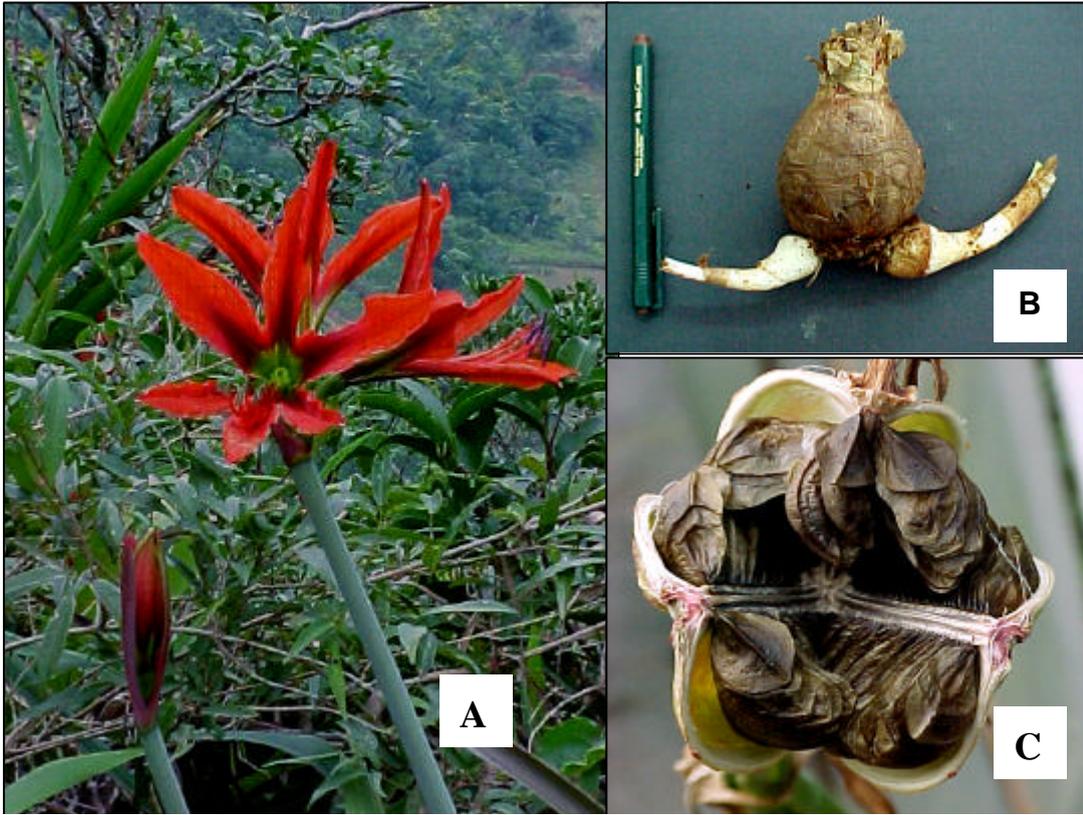


Figura 1 – Aspectos da fenologia e morfologia de *Hippeastrum aulicum*. (A) Florescimento no seu habitat natural; (B) produção de bulbos; (C) fruto maduro com sementes.

A espécie também se destaca pela época do ano em que floresce (DUTHIL, 1987). Em Florianópolis, SC, o florescimento ocorre nos meses de abril e maio, período em que há pouca disponibilidade de flores no mercado, o que lhe confere uma grande vantagem na sua utilização como planta ornamental. No seu habitat natural, as flores permanecem abertas em torno de sete dias.

Apesar do seu valor como ornamental ser reconhecido em outros países, poucos trabalhos foram encontrados sobre a propagação de *Hippeastrum* e nenhum voltado a espécie *H. aulicum*. Na literatura, os trabalhos estão direcionados a estudos propagativos de *H. hybridum* e outras espécies mais conhecidas e comercializadas que *H. aulicum*. Os métodos de propagação mais utilizados em *Hippeastrum* são: a divisão dos bulbos, a germinação de sementes e a estaquia das bainhas foliares (HARTMANN, KESTER, DAVIES, 1990; HUANG et al., 1990; OKUBO, 1993; STANCATO, 1993; TOMBOLATO, AZEVEDO, NAGAI, 1994; SMITH, BURROWS, KUERTEN, 1999; EPHRATH et al., 2001).

O *Hippeastrum* pode ser propagado através da divisão dos bulbos que se formam naturalmente no bulbo-mãe, mas este método é pouco eficiente, tendo em vista que são produzidos poucos propágulos por ano (STANCATO, 1993). Dependendo da cultivar de *Hippeastrum*, são produzidos em média 2,7 bulbos por planta por ano (OKUBO, 1993). A baixa produção de propágulos também foi verificada em *Hippeastrum aulicum* em estudos preliminares, por nós desenvolvidos na casa de vegetação no CCA da UFSC. Constatou-se que são produzidos de 1 a 2 bulbos por planta por ano (Figura 1 - B) o que representa uma quantidade muito reduzida quando objetiva-se a propagação comercial pois, segundo Okubo (1993), a multiplicação natural é apropriada para propagação de plantas que produzem no mínimo 3 bulbos por ano.

A propagação por sementes tem sido mais utilizada para o melhoramento genético, visando o desenvolvimento de novas cultivares (CARPENTER & OSTMARK, 1988; OKUBO, 1993). A campo, observamos que *H. aulicum* produz cerca de 200 sementes por fruto, o que pode representar uma fonte de propágulo potencial para a propagação desta espécie (Figura 1 – C).

Nos países tradicionalmente produtores de *Hippeastrum*, a estaquia de bainhas foliares tem sido o método mais utilizado na propagação comercial das espécies (VIJVERBERG, 1981; HARTMANN, KESTER, DAVIES, 1990; TOMBOLATO, AZEVEDO, NAGAI, 1994), pois através deste método pode ser

aumentada a taxa de multiplicação, além de manter as características da planta matriz. A multiplicação *in vitro* também tem sido descrita (MII, MORI, IWASE, 1974; HUSSEY, 1975; BAPAT & NARAYAMASWAMY, 1976; BOSE & JANA, 1977; YANAGAWA & SAKANISHI, 1977; HUANG et al., 1990; PRASAD & CHATUVERDI, 1993; TOMBOLATO et al., 2001). Este método permite minimizar problemas associados à multiplicação, melhoramento e sanidade, favorecendo a obtenção de material básico livre de patógenos.

A exploração econômica de espécies nativas ornamentais, como *Hippeastrum aulicum*, é relevante dos pontos de vista econômico, conservacionista, bem como sob o âmbito social. Além de ser ornamental, esta espécie pode representar também fonte de caracteres de interesse, como o de rusticidade e contribuindo para o aumento de variações morfológicas ao serem cruzadas com cultivares já comercializadas. Entretanto, tendo em vista que as informações sobre cultivo de plantas bulbosas, encontradas na literatura, estão centralizadas em poucos gêneros, são necessários estudos sobre os requerimentos básicos, para a multiplicação e o cultivo de *H. aulicum*, para possibilitar sua exploração econômica. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologias para propagação da espécie *Hippeastrum aulicum*, bem como contribuir para o conhecimento na fisiologia do desenvolvimento de uma planta bulbosa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAPAT, V. A.; NARAYANASWAMY, S. Growth and organogenesis in explanted tissues of *Amaryllis* in culture. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**. New York, v. 103, n.2, p. 53-56, 1976.

BOSE, T. K.; JANA, B. K. Regeneration of plantlets in *Hippeastrum in vitro*. **Indian Journal of Horticulture**, Bangalo, v.34, n.4. 1977.

CHAMAS, C. & MATTHES, C. Método para levantamento de espécies nativas com potencial ornamental. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 6, n ½, p.53-63, 2000.

DE HERTOOGH, A., et al. Marketing opportunities for ornamental geophytes. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 325, p. 319-324. 1992.

DE HERTOOGH, A.; LE NARD, M. World production and horticultural utilization of flower bulbs. In: DE HERTOOGH, A., LENARD, M. **The physiology of flower bulbs**. The Netherlands: Elsevier, 1993. P.21-28.

DE HERTOOGH, A.; GALITTANO, L. Influence of photoperiod and day/night temperatures on flowering of *Amaryllis (Hippeastrum)* cv. Apple blossom. **Acta Horticulturae**. Wageningen, v. 515, p.129-134. 2000.

DUTHIL, J. H. A. **Investigações citotaxonômicas em populações brasileiras de *Hippeastrum* Herb.** 1987. 131 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DUTHIL, J. H. A. ***Hippeastrum aulicum*** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <pflores@bol.com.br> em 09 abr. 2001.

EPAGRI. **Projetos:** Floricultura. Disponível em: <<http://www.epagri.rct-sc.br>>. Acesso em: 02 de janeiro de 2003.

EPHRATH, J. E., et al. Various cutting methods for the propagation of *Hippeastrum* bulbs. **Biotronics**, Vancouver, v. 30, p. 75-83, 2001.

FLORY, W. S. Overview of chromosome evolution in the Amaryllidaceae. **Nucleus**, Calcutta, v. 20, p. 70-88, 1977.

HARDMAN, C. Trends in modern *Hippeastrum* hybridizing. **Herbertia**, Pasadena, v. 52, p.168-178, 1997.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E., DAVIES, F. T. Propagation by specialized stems and roots. In: **Plant Propagation: principles and practices**. 5 ed. New Jersey : Prentice-Hall, 1990. P. 429-458.

HERBERT, W., 1821. In: DUTHIL, J. H. A. **Investigações citotaxonômicas em populações brasileiras de *Hippeastrum* Herb.** 1987. 131 f.. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

HUANG, C. W., et al. Importance of two scale in propagating *Hippeastrum hybridum* by twin scaling. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 42, n. (1-2), p. 141-149, 1990.

HUSSEY, G. Totipotency in tissue explants and callus of some members of the Liliaceae, Iridaceae, and Amaryllidaceae. **Journal of Experimental Botany**. Oxford, v. 26, p. 253-262, 1975.

IBAMA. **Conservação e Manejo Sustentável da Flora Nativa do Brasil**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br>>. Acesso em: 10 de setembro 2002.

INFORMATIVO IBRAFLOR. Brasil: mostra sua flora – Flores Tropicais. Ano VII, n. 24, s/ p., abril/2001.

INFORMATIVO SECEX. **Secretaria de Comércio Exterior**. Panorama Setorial: Flores e Plantas Ornamentais. Ano V, n.31, s/ p., Março/2002.

INSTITUTO PLANTARUM. **Açucenas**. Disponível em: <<http://www.plamntarum.com.br>>. Acesso em: 10 de setembro 2002.

JAMIELSON, R. Uso da flora nativa em projetos de ajardinamento. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS. Porto Alegre, 1988. **Anais...** Porto Alegre, 1988. p. 69-72.

KÄMPF, A. N. A floricultura brasileira em números. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamentais**. Campinas, v. 3, n. 1, p. 1-7, 1997.

MEEROW, A. W. Breeding Amaryllis. **Herbertia**, Pasadena, v. 54, p. 67-83, 2000.

MEEROW, A. W.; KANE, M. F.; BROSCAT, T. K. Breeding of new *Hippeastrum* cultivars using diploid species. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 325, p. 583-588, 1992.

MELLO FILHO, L. E. Botânica e arquitetura ou segundo a ordem alfabética arquitetura e botânica. **A Lavoura**, Rio de Janeiro, n. 612, p. 42-43, 1995.

MIL, M.; MORI, T.; IWASE, N. Organ formation from excised bulb scales of *Hippeastrum hybridum in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, London, v. 49, n. 3, p. 241-244. 1974.

OKUBO, H. *Hippeastrum* (Amaryllis) In: DE HERTOGH, A. & LE NARD, M. **The physiology of flower bulbs**. The Netherlands: Elsevier, 1933. P. 321-334.

PRASAD, R. N.; CHATUVERDI, H. C. Rapid introduction of cloned plants of Amaryllis in long term culture. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.31, n.3, p. 242-246, 1993.

SCHOENMAKER, N. J.; GRAZIANO, T. T. Influência da temperatura e do tempo de armazenamento dos bulbos no desenvolvimento de *Hippeastrum x hybridum* Hort. Apple Blossom. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.1, n.1. p. 48-55, 1995.

SMITH, R. H.; BURROWS, J.; KUERTEN, K. Challenges associated with micropropagation of *Zephyranthes* and *Hippeastrum* sp (Amaryllidaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, [sl], v. 35, n. 4, p. 281-282. 1999.

STANCATO, G. C. **Fisiologia do crescimento em *Hippeastrum hybridum* cv Apple Blossom**: relações fonte:dreno. 1993. 52 f.. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

TOMBOLATO, A. F., et al. Micropropagação de *Hippeastrum hybridum* Apple Blossom mediante escamas duplas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 7, n.1, p. 35-40. 2001.

TOMBOLATO, A. F.; AZEVEDO, C.; NAGAI, V. Effects of auxin treatments on *in vivo* propagation of *Hippeastrum hybridum* Hort. by twin scaling. **Hortscience**, Alexandria, v. 29, n. 8, p. 922. 1994.

VIJVERBERG, A. J. **Growing Amaryllis**. London: Grower Books, 1981. 57 p. (Grower Guide, 23).

YANAGAWA, T.; SAKANISHI, Y. Regeneration of the bulblet on *Hippeastrum* bulb segments excised from various parts of a parent bulb. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**. Kyoto, v. 46, p. 250-260, 1977.

CAPÍTULO 1 – GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb (Amaryllidaceae).

1. RESUMO

A variabilidade genética é vantajosa para a seleção de genótipos de interesse comercial, sobretudo para plantas ornamentais, tendo em vista que o mercado está em constante busca por plantas com novas formas e cores. A variabilidade genética pode ser alcançada com plantas produzidas a partir de sementes. Tendo em vista a importância de *Hippeastrum aulicum* como planta ornamental e devido à carência de informações sobre a influência dos fatores ambientais sobre a germinação de suas sementes, foram realizados estudos sobre os efeitos da luz e da temperatura sobre a germinação e velocidade de germinação. As sementes foram semeadas em caixas gerbox, com papel filtro umedecido e mantidas em câmara de crescimento (B.O.D.) nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C, sob luz ou escuro contínuo. O ensaio foi conduzido durante 13 dias. A temperatura foi o único fator a influenciar a porcentagem final de germinação das sementes de *H. aulicum*. Verificou-se que a presença de luz não afetou a germinação total das sementes, mas atrasou o início do processo germinativo. Até os 12 dias do início do experimento, a maior porcentagem de germinação e velocidade de germinação foram obtidas com as sementes mantidas na ausência de luz e nas temperaturas de 25 °C e 35 °C. A partir do 13º dia, não houve diferença quanto ao tratamento de luz na porcentagem e velocidade de germinação.

2. ABSTRACT

Seed germination of *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb (Amaryllidaceae).

The genetical variability is profitable for the selection of genotypes of commercial interest, however for ornamental plants, having in sight that the market is in constant search for plants with new shapes and colors. Genetical variability can be reached with plants from seeds. Having in sight the importance of *Hippeastrum aulicum* as ornamental plant and due to the lack of information about the influence of environmental factors about germination of its seeds, studies about light and temperature effects on germination and germination speed were accomplished. Seeds were sowed in gerbox boxes, with a moistened paper filter and kept in a growth chamber (B.O.D) at temperatures of 15 °C, 25 °C and 35 °C under light or continual dark. The essay were conducted during 13 days. Temperature was the only factor to influence the final percentage of germination of *H. aulicum* seeds. It was verified that the presence of light did not affect the total seed germination, but it delayed the beginning of the germinative process along with temperature. Until the 12th day from the beginning of the experiment, the greater percentage of germination and germination speed were obtained with the seeds being kept in absence of light and at temperatures ranging from 25 °C to 35 °C. From the 13th day on, there was not difference about the light treatment in percentage and germination speed.

3. INTRODUÇÃO

A variabilidade genética presente em populações naturais permite a maior adaptação ecológica das espécies. Em programas de conservação de germoplasma de espécies ameaçadas de extinção, a manutenção desta variabilidade é relevante pois evita o risco de estreitamento da base genética (ALVES & GUERRA, 2001). A variabilidade genética também é de grande interesse em programas de melhoramento, pois é requisito básico para a seleção de genótipos. Além de atributos adaptativos e de rusticidade, estes programas buscam a obtenção de caracteres morfológicos de interesse comercial, o que é de grande importância para plantas ornamentais, tendo em vista que o mercado está em constante busca por plantas com novas formas e cores.

Dentre outros métodos, a variabilidade genética pode ser obtida através de plantas produzidas a partir de sementes. A propagação por sementes é utilizada para o desenvolvimento de novos cultivares de *Hippeastrum* (OKUBO, 1993) além de ser utilizada como método para produção comercial destas plantas (CARPENTER & OSTMARK, 1988). Apesar disto, poucos trabalhos foram encontrados na literatura consultada sobre os fatores ambientais que promovem a germinação das sementes de plantas deste gênero e nenhum trabalho foi encontrado sobre a espécie *H. aulicum*. Estudos sobre tais fatores são necessários para a otimização da propagação de plantas por meio de sementes. Devido à carência de informações sobre esta espécie, serão relatados apenas trabalhos relativos à germinação de sementes de outras espécies, ou híbridos do gênero *Hippeastrum*.

Vários fatores extrínsecos e intrínsecos à semente podem exercer influência sobre a germinação. Em muitos casos, o controle do desenvolvimento do embrião, para evitar a germinação precoce, pode ser restrito à ocorrência de algum fator externo à semente. A não ocorrência deste fator pode impedir a germinação da semente, mesmo que o embrião esteja viável. Assim, é necessário um conjunto de condições favoráveis para que a germinação ocorra.

Sementes de plantas bulbosas provenientes de regiões de clima tropical não apresentam dormência, germinando rapidamente quando em condições ambientais favoráveis (CHAPMAN, 2000). De acordo com este autor, isto se deve ao fato de que fatores climáticos como temperatura e umidade são relativamente estáveis nestas regiões, não havendo necessidade destas plantas desenvolverem dormência nas suas sementes durante o ciclo evolutivo. A ausência de dormência foi verificada em sementes de híbridos de *Hippeastrum* por Okubo (1993), Menzel (1988) e Read (1998). Segundo estes autores, as sementes de *Hippeastrum* apresentam, em geral, alto potencial germinativo, bem como alta velocidade na germinação.

A velocidade de germinação varia em função da temperatura a qual as sementes são submetidas. Para a maioria das espécies de plantas, dentro de certos limites, a elevação da temperatura leva ao aumento da velocidade de embebição das sementes, aumentando as atividades enzimáticas e metabólicas (DECETTI, 2000). Read (1998) observou que a uma temperatura de 21 °C, sementes recém colhidas de *Hippeastrum* germinam entre 4 a 10 dias após a semeadura. O mesmo foi observado por Okubo (1993), porém, a uma temperatura de 25 °C. Estes autores também observaram que o vigor das sementes diminui rapidamente após 4 a 12 meses, mesmo em ambiente com temperatura e umidade relativa do ar controlados, pois são sementes de curta longevidade. Segundo Carpenter & Ostmark (1988a) reduzindo o teor de água da semente (97%) e armazenando as sementes à temperaturas de 5 a 15 °C e 11 a 52% de UR é possível manter a viabilidade das sementes até 12 meses.

Além de afetar a velocidade de germinação das sementes, a temperatura também influencia na uniformidade de germinação e na percentagem total de germinação (BEWLEY & BLACK, 1994; CARVALHO & NAKAGAWA, 1988). Carpenter & Ostmark (1988b) obtiveram as maiores porcentagens de germinação (86%) em sementes de *Hippeastrum hybridum* quando estas foram submetidas a 25 °C. Pindel (1990) e Carpenter & Ostmark (1988b) observaram que temperaturas abaixo de 20 °C, ou acima de 30 °C, inibem a germinação em sementes de *Hippeastrum*. Estas informações estão de acordo com o observado por Read (1998) e Okubo (1993) que sugerem que temperaturas entre 21 °C e 25 °C são mais adequadas para a germinação de sementes de *Hippeastrum*. Estes dados indicam que existe uma faixa de temperatura ótima para a máxima germinação de sementes de espécies deste gênero.

Além da temperatura, a luz também exerce influência sobre a germinação de sementes de um grande número de espécies de plantas, sobretudo aquelas que habitam em locais ensolarados (LEITE & TAKAKI, 2001). Em sementes fotolátentes, as quais incluem a maioria das sementes de plantas não domesticadas, a luz é um fator necessário para a germinação (BASKIN & BASKIN, 1988). Após a embebição deste tipo de semente, ocorre o aumento na conversão fotoquímica do fitocromo da forma inativa para a ativa, desencadeando os processos que culminam na germinação (LEITE & TAKAKI, 2001). A necessidade de luz para germinação das sementes é interpretada como um mecanismo adaptativo para garantir que as sementes germinem em locais onde a probabilidade do estabelecimento das plântulas seja alta (LEITE & TAKAKI, 2001). A espécie *Hippeastrum aulicum*, no seu habitat natural, é encontrada principalmente em clareiras (DUTHIL, 1986), o que poderia indicar a fotolátência de suas sementes. As informações encontradas na literatura consultada sobre a influência da luz sobre a germinação das sementes de *Hippeastrum* são contraditórias. De acordo com Okubo (1993) e Carpenter & Ostmark (1988), estas sementes são indiferentes à presença de luz para germinarem. Read (1998) recomenda expor as sementes à luz para germinarem. Porém Menzel (1988) recomenda semear as sementes ao abrigo da luz.

A luz também pode influenciar a germinação de sementes através de sua interação com a temperatura (LEITE & TAKAKI, 2001). Chojnowski & Mynett (1992) observaram que a luz superou a termo-inibição da germinação de sementes de *Lilium pumilum*. Estes autores observaram que a irradiação de luz constante não afetou a germinação à 20 °C, mas aumentou a germinação à 30 °C.

A carência de informações sobre a influência dos fatores ambientais sobre a germinação de sementes de *Hippeastrum aulicum* fundamenta a necessidade deste trabalho. Neste sentido, foram realizados estudos sobre os efeitos da luz e da temperatura sobre a porcentagem e velocidade de germinação das sementes desta espécie.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste ensaio foi verificada a influência da luz e temperatura sobre a germinação de sementes de *H. aulicum*. Foram utilizados dois níveis de luz: luz constante e ausência de luz e três níveis de temperatura: 15, 25 e 35 °C ± 0,5 °C.

Para realização deste trabalho foram coletados frutos maduros de *H. aulicum* na área da UCAD, localizada no município de Florianópolis, SC (27°50' S de latitude e 48°25' W de longitude). O critério para definir a maturidade dos frutos foi baseado na sua coloração avermelhada e na firmeza do fruto.

Os frutos foram abertos e as sementes, extraídas e desinfestadas com uma solução de hipoclorito de sódio (0,8% cloro ativo), durante 30 minutos, seguida de três lavagens em água destilada, para a eliminação do excesso da solução desinfetante.

Após a assepsia, as sementes foram semeadas em caixas plásticas (gerbox), próprias para testes de germinação, contendo papel umedecido com água destilada. O experimento foi realizado em estufa incubadora (B.O.D.), com lâmpadas fluorescentes (Sylvânia 40 w), com irradiância de 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Para o tratamento com escuro contínuo, as caixas foram cobertas com duas folhas de papel alumínio para não permitir a passagem de luz para o interior do recipiente. As avaliações da germinação das sementes que permaneceram sob ausência de luz foram realizadas sob luz verde para não influenciar nos resultados dos tratamentos onde se avaliou o efeito da luz na germinação, conforme recomendado por Carpenter et al. (1995).

A protusão da radícula foi considerada como indicativo da ocorrência da germinação. O ensaio foi conduzido até o 13^o dia e os registros da porcentagem e velocidade de germinação das sementes foram feitos a cada dois dias. Para o cálculo da velocidade de germinação foi feita adaptação da fórmula utilizada por Krzyzanowski et al. (1999):

$$\text{IVG} = \text{G1:N1} + \text{G2:N2} + \dots \text{Gn:Nn}$$

Onde:

IVG = índice de velocidade de germinação;

G1, G2, Gn = porcentagem de sementes com radícula aparente computadas na primeira contagem, na segunda e na última contagem;

N1, N2, Nn = número de dias da semeadura à primeira, à segunda e à última contagem.

Foi calculado o IVG de cada repetição. O IVG da amostra foi a média aritmética das quatro repetições.

$$\text{IVG (amostra)} = (\text{IVG1} + \text{IVG2} + \text{IVG3} + \text{IVG4}) : 4$$

Para cada combinação dos fatores luz e temperatura, foram empregadas quatro repetições de 25 sementes. O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado em um esquema fatorial 2 × 3. Os dados foram transformados para $\log(y + 1)$ e a análise dos resultados foi efetuada segundo Sokal & Rohlf (1995) através do programa STATGRAFICS. Quando detectados efeitos significativos, a comparação de médias foi realizada pelo teste DMS, à 5% de probabilidade de erro.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 2 dias da semeadura, foi verificada a germinação das sementes de *H. aulicum*, em ambiente com ausência de luz (Tabela 1 e Figura 2). Este resultado indica a não existência de dormência nas sementes da espécie. Resultados semelhantes foram obtidos por Chapman (2000). Segundo este autor, as sementes da maioria das bulbosas tropicais não apresentam dormência. As sementes de *H. aulicum* mantidas no escuro iniciaram o processo de germinação de 2 a 4 dias antes que aquelas mantidas na luz, independente da temperatura (Figura 2). Portanto, a temperatura não teve efeito significativo no início do processo germinativo apesar de as sementes mantidas em temperaturas de 35 e 25 °C, germinaram em maior porcentagem que as sementes mantidas a 15 °C, em presença ou ausência de luz .

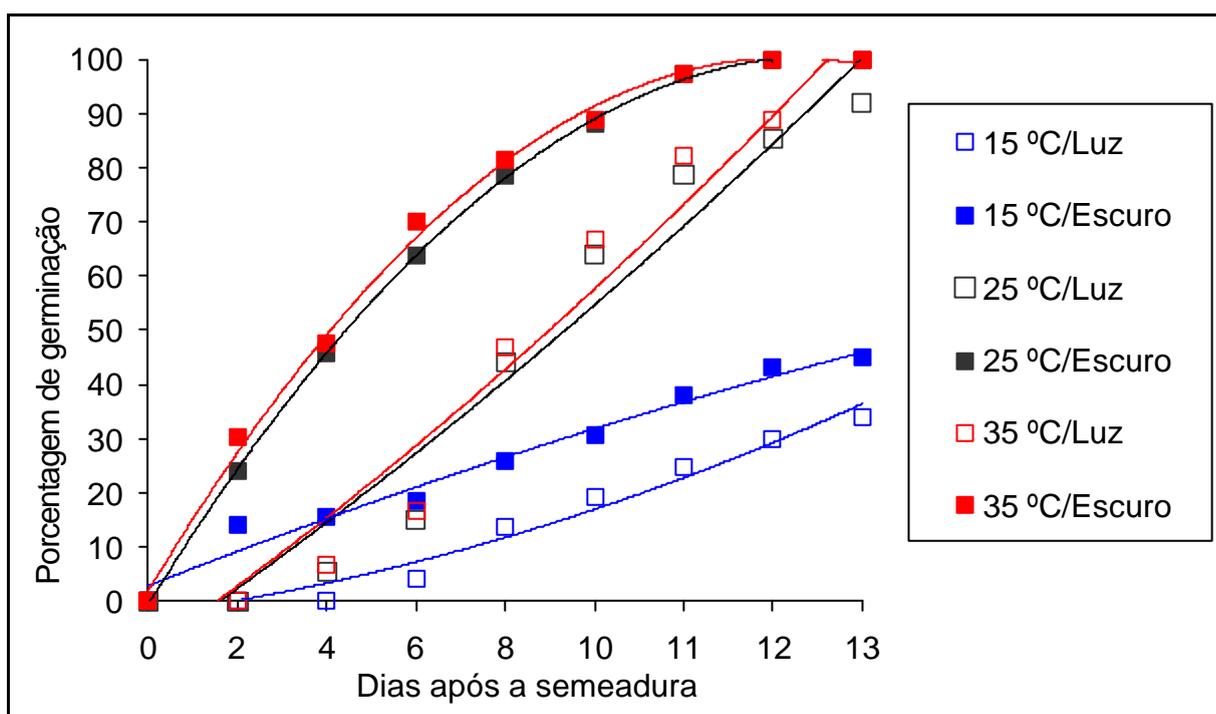


Figura 2 –Porcentagem da germinação de sementes de *Hippeastrum aulicum* em diferentes temperaturas e condições de luminosidade.

A partir do 4º dia, a temperatura passou a influenciar a porcentagem de germinação juntamente com o fator luz, sendo que as maiores porcentagens de germinação foram obtidas com as sementes na ausência de luz e nas temperaturas de 25 e 35 °C. Estes dados contrariam os observados por Read (1998) e Okubo (1993). Segundo estes autores, a temperatura é o único fator a exercer influência na germinação de sementes de *Hippeastrum*, ficando as maiores porcentagens de germinação dentro da faixa de 21-25 °C.

Aos 13 dias, apenas a temperatura passou a ter influência sobre o processo germinativo. As maiores porcentagens de germinação ocorreram na faixa dos 25-35 °C (Tabela 1 e Figura 2).

Tabela 1 – Porcentagem da germinação de sementes de *Hippeastrum aulicum* em diferentes temperaturas e condições de luminosidade, após 13 dias da semeadura.

Luminosidade	Temperatura (±0,5 °C)	Porcentagem de germinação
Luz constante	15	34,14b
	25	92,00a
	35	100,00a
Escuro constante	15	44,90b
	25	100,00a
	35	100,00a
C. V. (%)		8,19

Médias seguidas com a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste DMS, ao nível de 5% de probabilidade.

Não foram encontrados na literatura, trabalhos relatando o retardamento do início da germinação pela luz. Entretanto, Menzel (1988) recomendou semear as sementes de *Hippeastrum* ao abrigo da luz para as primeiras fases da germinação, e segundo Holloway (1987), sementes de *Iris setosa* são indiferentes a presença de luz para germinarem, porém as maiores porcentagens de germinação são obtidas na ausência de luz. As observações destes autores indicam que a ausência de luz é necessária para o início da germinação, assim como o observado no presente

trabalho. No entanto, estes autores não relataram em seus trabalhos a ocorrência de retardamento inicial da germinação influenciado pela luz.

Devido ao fato de o bulbo ser um órgão subterrâneo, e por se desenvolver em ambiente com ausência de luz, acredita-se que o embrião possua algum mecanismo que reconheça esta condição, direcionando seu crescimento para ambientes com ausência de luz. O padrão de germinação da espécie dá suporte a esta hipótese. O embrião aumenta de volume, rompe o tegumento emite a radícula sem, no entanto apresentar estruturas foliares visíveis (Figura 3 A). Subseqüentemente, ocorre o entumescimento na região do hipocótilo do embrião dando origem a um pró-bulbo (Figura 3 B e C). Após a bulbificação, ocorre o desenvolvimento de uma raiz contráctil para em seguida ocorrer a formação das folhas. Nas sementes expostas a luz constante, as raízes contrácteis apresentaram coloração violácea e impulsionaram o bulbo para a direção oposta da fonte luminosa. Nestas sementes foi observada visualmente a formação de um pró-bulbo de menor tamanho que aqueles produzidos no escuro constante, provavelmente devido ao gasto de substâncias de reserva ao redirecionar o crescimento da plântula (Figura 3 D e E).



Figura 3 – Seqüência do processo germinativo de sementes de *H. aulicum*: A – crescimento do embrião; B – entumescimento do hipocótilo; C – formação de raiz contráctil na base do pró-bulbo; D - plântula obtida de germinação de sementes na ausência de luz; E - plântula obtida da germinação de sementes sob luz constante. Barra = 1 cm.

Este padrão de germinação também é observado em outras monocotiledôneas bulbosas, como por exemplo em *Nerine* (BROWN et al., 1999), *Hymenocallis* (WHITEHEAD & BROWN, 1940) e *Crinum* (ISAAC & MCGILLIVRAY, 1965). Segundo Brown et al. (1999), a ação da raiz contráctil em impulsionar o pró-bulbo para dentro do substrato é um mecanismo adaptativo para garantir a sobrevivência da planta na fase de dormência.

A temperatura e a luz exerceram efeitos semelhantes sobre a velocidade de germinação em relação ao observado para a porcentagem de germinação (Figura 4). Até dois dias após a sementeira, a velocidade de germinação foi afetada apenas pela luz. Nos dias seguintes, a temperatura, juntamente com a luz, exerceu efeitos significativos na velocidade de germinação.

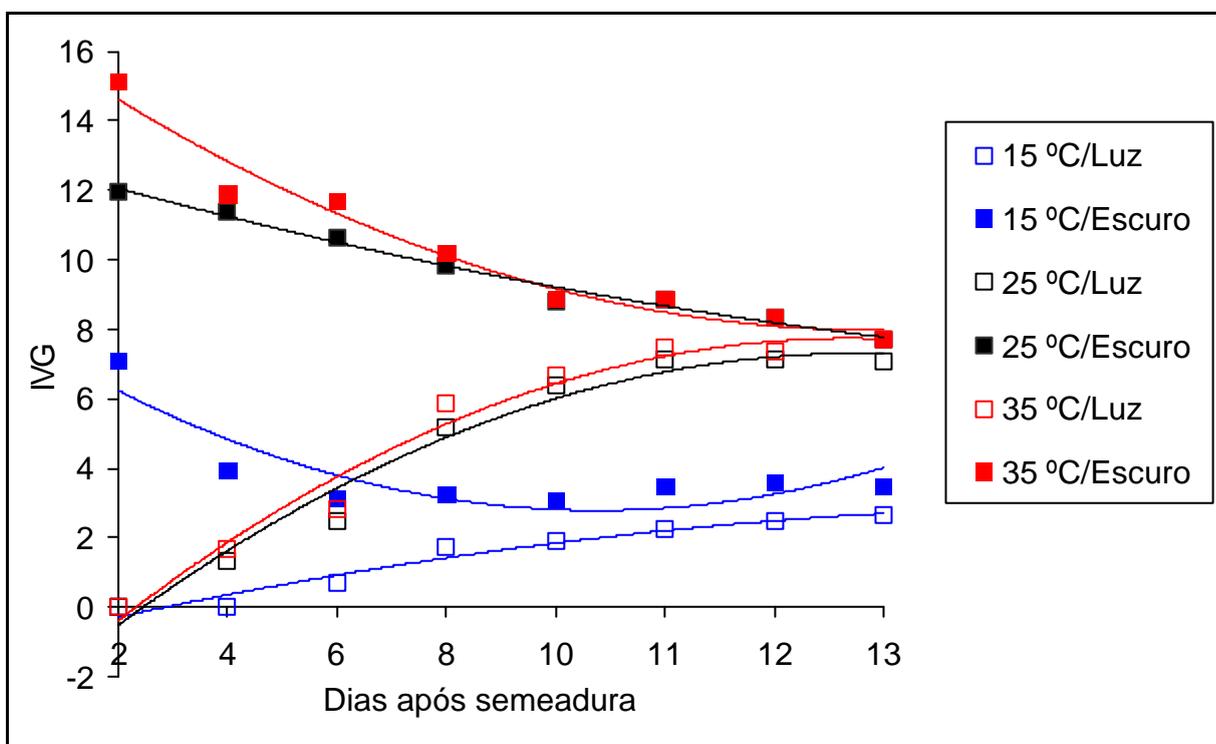


Figura 4 – Velocidade de germinação (IVG) de sementes de *H. aulicum* em diferentes temperaturas e luminosidade.

Foram observadas diferenças significativas na velocidade de germinação em função da temperatura durante todo o período de observações, exceto aos 2 dias após a sementeira quando apenas a luz exerceu influência (Figura 4). As maiores velocidades de germinação foram observadas nas sementes mantidas nas

temperaturas de 25 °C e 35 °C, em escuro contínuo. A luz não exerceu influência sobre a velocidade de germinação aos 13 dias da semeadura.

Os altos valores de porcentagem e velocidade de germinação das sementes de *H. aulicum* obtidos neste trabalho estão de acordo com Chapman (2000); Read (1998); Okubo (1993) e Menzel (1988). Segundo estes autores, sementes de *Hippeastrum* apresentam valores de aproximadamente 90% de germinação em temperaturas entre 21 °C e 25 °C. No presente trabalho, a germinação total e a velocidade final da germinação das sementes de *Hippeastrum aulicum* foram influenciadas inicialmente pela luz. Após 4 dias da semeadura, a germinação passou a ser influenciada pela luz e pela temperatura, sendo este último fator o único a exercer influência aos 13 dias após a semeadura. As melhores porcentagens e velocidades de germinação foram obtidas com 25 °C e 35 °C, na ausência de luz. Segundo Carpenter & Ostmark (1988b), temperaturas abaixo de 20 °C e acima de 30 °C inibiram a germinação das sementes. No presente trabalho, isto foi verdadeiro para o limite inferior, mas não para o limite superior de temperatura. Segundo Brown et al. (1999), a inibição ou retardamento do crescimento do embrião em condições de frio auxilia na sobrevivência das plântulas durante o inverno, em sementes que não possuem um mecanismo de dormência. Analisando a curva de germinação das sementes de *H. aulicum* neste trabalho (Figura 2), observa-se que não foi obtida uma temperatura limite para germinação, abrindo perspectivas para novos estudos com temperaturas mais elevadas para obtenção de uma faixa de germinação ótima para esta espécie.

Apesar da presença de luz retardar o início do processo de germinação e a velocidade inicial, as sementes de *H. aulicum* são indiferentes a este fator para germinarem, tendo em vista a ocorrência de germinação independente deste fator. Isto demonstra que a espécie apresenta um grande potencial adaptativo a diferentes ambientes. Segundo Mayer et al. (1982), plantas com sementes que germinam em condições de baixa luminosidade, ou ausência de luz, podem ocupar vários microhabitats existentes na mata, como fendas em rochas, ou o próprio solo recoberto por acúmulo de folhas.

Apesar das altas porcentagens de germinação observadas nestas condições experimentais, no local de coleta das sementes a campo as plantas se encontravam em pequenos grupos isolados, à primeira vista tendo origem da multiplicação vegetativa natural dos bulbos. Uma explicação para este fato poderia ser o intenso

ataque de predadores às sementes, em seus habitats naturais, tornando a propagação via semente mais esporádica na mata. O mesmo foi observado por Santa-Catarina et al. (2001) em *Ocotea odorifera*. Esta espécie tem a germinação de suas sementes dificultada no seu local de ocorrência, dentre outros fatores, devido ao ataque de insetos e fungos antes e após a maturação fisiológica, o que diminui a probabilidade de produzir um grande número de indivíduos por unidade de área.

Os valores encontrados para porcentagem de germinação das sementes de *H. aulicum*, próximos ou iguais a 100%, indicam que a propagação sexuada pode ser considerada como uma prática eficiente para a obtenção de novas plantas. No entanto, deve-se salientar algumas dificuldades encontradas durante este trabalho, como a obtenção de poucos frutos por inflorescência e a sazonalidade de produção.

Estas informações são de grande importância, pois servem de subsídio aos produtores de mudas, de modo que os mesmos possam conduzir a germinação de sementes em ambiente adequado e obter o máximo de germinação, evitando perdas. Uma germinação rápida é importante para diminuir o tempo em que as sementes ficam expostas ao ataque de microorganismos. Segundo Carpenter & Ostmark (1988b), sementes hidratadas expostas durante longos períodos em condições ambientais adversas perdem a viabilidade. Isto tem sido erroneamente associado à baixa longevidade das sementes de *Hippeastrum* após a colheita. Neste contexto, recomenda-se semear as sementes de *H. aulicum* ao abrigo da luz, ou a semeadura em ambiente com temperaturas de 25 °C a 35 °C.

6. CONCLUSÕES

- Sementes de *Hippeastrum aulicum* apresentam um alto potencial germinativo;
- O início do processo germinativo ocorre rapidamente após a semeadura, não apresentando dormência;
- A temperatura afeta a velocidade de germinação e a porcentagem final de germinação, sendo que temperaturas de 25 °C e 35 °C induzem maiores porcentagens de germinação e velocidades de germinação ;
- A porcentagem final de germinação não é afetada pela presença de luz, porém esta afeta negativamente o início do processo;
- A propagação sexuada é um método viável para a propagação da espécie *Hippeastrum aulicum*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G. M & GUERRA, M. P. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburguensis* var. *paludosa* from microbuds. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, Fl, v.51, n.5, p.202-211, 2001.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. Germination ecophysiology of herbaceous plant species in a temperate region. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 75, p. 286-305. 1988.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BROWN, N. R., et al. Reproductive biology of *Nerine* (Amaryllidaceae) II: Embryo development and seed germination. **Herbertia**, Pasadena, v.54. 153-170p. 1999.

CARPENTER, W. J., et al. Irradiance level and duration required to terminate the dormancy of *Begonia x semperflorens* seed. **Hortscience**, Alexandria, v.30, n.2, p. 252-254, 1995.

CARPENTER, W. J.; OSTMARK, E. R. Moisture content, freezing, and storage conditions influence germination of amaryllis seed. **Hortscience**, Alexandria, v. 23, n. 6, p. 1072 – 1074, 1988a.

_____. Sensitivity of seed germination of amaryllis to light and temperature. **Hortscience**, Alexandria, v. 23, n. 6, p. 1002 – 1004, 1988b.

CARVALHO, N.M. ; NAKAGAWA, J. **Semente, ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargil, 1988. 424 p.

CHAPMAN, D. Starting with seed. International bulb society. **Herbertia**, Pasadena, v. 54, n. 2, p.6-7, 2000.

CHOJNOWSKI, M.; MYNET, K. Germination of *Lillium pumilum* seeds. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 325, n. 1, p. 235-238, 1992.

DECETTI, S. F. C. **Propagação in vitro de *Annona glabra* L.** 2000. 101 f.. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DUTHIL, J. H. A. **Investigações citotaxonômicas em populações brasileiras de *Hippeastrum* Herb.** 1987. 131 f.. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
FLORY, 1977

HOLLOWAY, P. S. Seed germination of Alasca íris, *Íris setosa* ssp. *Interior*. **Hortscience**, Alexandria, v.22, n.5, p. 898-899, 1987.

ISAAC, W. M.& MCGILLIVRAY, G. A note on the water storing seeds of two species of *Crinum* and of some other South African Amaryllidaceae (sub-family Amaryllioideae). **Annals of Botany**, London, v.29, p. 739-740, 1965.

KRZYZANOWSKI, F. C. **Vigor de sementes:** conceitos e testes. ABRATES – Comitê de Vigor de Sementes. Londrina, 1999. 218 p.

LEITE, I.T. de A. & TAKAKI, M. Phytochrome and temperature control of seed germination in *Muntingia calabura* L. (Elaeocarpaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.44, n.3, p. 297-302, 2001.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A.. **The germination of seeds.** 3 ed. Oxford: Pergamon Press, 1982. 211 p.

MENZEL, C. H.. Raising *Hippeastrum* bulbs from seeds. **Herbertia**, Pasadena, v. 44, n. 1, p. 22-24. 1988.

OKUBO, H. *Hippeastrum* (Amaryllis) In: DE HERTOGH, A. & LE NARD, M. **The physiology of flower bulbs.** The Netherlands: Elsevier, 1993. p.321-334.

PINDEL, Z. Effect of conditions and time of seed storage on germinating ability in *Hippeastrum*. **Prace Instytutu Sadownictwa i kwiaciarnictwa w Skierniewicach.** Seria B, Rosceliny Ozdobne, v.15, p.51-58, 1990.
PRASAD & CHATUVERDI, 1993

READ, V. Seed germination and early growth of *Hippeastrum* species and hybrids in water. **Herbertia**, Pasadena, v. 53, p. 116-119, 1998.

SANTA CATARINA, C.; MACIEL, S. C.; PEDROTTI, E. L.. 2001. Germinação in vitro e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea catharinensis* Mez.) **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, n.4, p.501-510, 2001.

SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. **Biometry**. 3 ed. San Francisco: Freeman and Company, 1995. 887 p.

WHITEHEAD, M. R. & BROWN, C. A. The seed of the spider lily, *Hymenocallis occidentalis*. **American Journal of Botany**, Columbus, v.27, p.199-203, 1940.

CAPÍTULO 2 – PROPAGAÇÃO DE *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae) ATRAVÉS DE BAINHAS FOLIARES

1. RESUMO

A estaquia de dupla camada de bainhas foliares tem sido utilizada como técnica de propagação vegetativa para aumentar a quantidade de propágulos em vários gêneros de plantas bulbosas que apresentam baixas taxas de reprodução como *Hippeastrum*. A formação de bulbos sobre as estacas depende da utilização de reguladores de crescimento e da disponibilidade de materiais de reserva nas bainhas para a formação do bulbo. A utilização de reguladores de crescimento também é útil para incrementar o enraizamento das estacas, tendo em vista que a baixa ocorrência de bulbos com raízes é uma das limitações deste sistema de propagação. Neste trabalho foi avaliado o enraizamento e produção de bulbos com a utilização de 0; 50; 100; 500 ou 1000 ppm de ANA ou de AIB, em estacas provenientes da região periférica e da região central de bulbos de *Hippeastrum aulicum*. De maneira geral, o uso de auxina reduziu a sobrevivência das estacas, o comprimento das raízes e o número de estacas com bulbos, mas aumentou o número de raízes e o número de bulbos por estaca. ANA foi mais efetivo que AIB para a indução de bulbos e raízes nas estacas de bainhas foliares. A maior porcentagem de estacas com bulbos foi obtida no tratamento com 50 ppm de ANA (70,83%) e o maior número de raízes por estaca foi obtido com 500 ppm de ANA (4,01 raízes). Com a utilização de estacas de bainhas foliares provenientes da região central do bulbo foram obtidas as maiores porcentagens de sobrevivência, bem como maior a produção de bulbos e de raízes.

2. ABSTRACT

Propagation of *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae) by bulb scales.

Twin-scaling has been used as vegetative propagation technique to increase the quantity of propagules in several species of bulbous plants that present low rates of reproduction as *Hippeastrum*. The bulbs formation depends on the utilization of the growth regulator and the availability of reserve substances into the scales for the bulb formation. The utilization of growth regulators is also useful to increase the rooting of the cuttings, having in sight that the low occurrence of bulbs with roots is one of the limitations of this propagation system. Rooting and bulbs production were evaluated in this work with the utilization of 0; 50; 100; 500; or 1.000 ppm of ANA or AIB in cuttings from peripheral area and in cuttings from central area of the bulbs of *Hippeastrum aulicum*. In a general manner, the utilization of auxin reduced the cutting survival, the roots length and the number of cuttings with bulbs, but it has increased the number of roots and the number of bulbs per bulb scale cuttings. ANA was much more efficient than AIB for rooting and bulb induction in bulb scale cuttings. The greater percentage of cuttings with bulbs was obtained in treatment with 50 ppm of ANA (70,83 %) and a greater number of roots per cuttings was obtained with 500 ppm of ANA (4,01 roots). With the utilization of bulb scales cutting from the inner area of the bulb, the greater percentage of survival, as well as a greater production of bulbs and roots were obtained.

3. INTRODUÇÃO

Várias técnicas de propagação vegetativa têm sido utilizadas para aumentar a quantidade de propágulos nas espécies bulbosas que apresentam baixas taxas de reprodução. Dentre as técnicas mais utilizadas, destacam-se a incisão basal do bulbo, utilizada principalmente para propagação de *Hyacinthus*, e a estaquia de bainhas foliares utilizada em *Hymenocallis*, *Narcissus*, *Nerine*, *Hippeastrum*, dentre outros (HARTMANN, KESTER, DAVIES, 1990). Dependendo do tamanho do bulbo, podem ser obtidas cerca de 60 plantas através do método de incisão basal (HARTMANN, KESTER, DAVIES, 1990) e de 60 a 70 plantas através da estaquia de bainhas foliares (STANCATO, 1993).

Nos países tradicionalmente produtores de bulbos, a técnica normalmente empregada para multiplicação de plantas bulbosas é a estaquia das bainhas foliares (OKUBO, 1993). Através desta técnica, os bulbos são seccionados transversal e longitudinalmente e, em seguida, são separadas as camadas de bainhas foliares unidas ou não a um segmento do caule para depois serem plantadas em substrato adequado. Quando utilizadas duas ou mais bainhas é necessária a presença de um segmento do caule para manter as bainhas unidas. Na junção entre as bainhas foliares e o caule os bulbos são formados (HARTMANN, KESTER, DAVIES, 1990), às expensas do material de reserva (STANCATO, 1993). A estaquia de dupla camada de bainhas foliares é utilizada na multiplicação comercial de *Narcissus* para a obtenção de estoques de plantas matrizes livres de vírus (ALKEMA, 1975; REES & HANKS, 1980; BRUNT, 1985; MOWAT et al., 1986), mas também é utilizada para propagação vegetativa de *Hippeastrum* (HARTMANN, KESTER, DAVIES, 1990; OKUBO, 1993; TOMBOLATO, AZEVEDO, NAGAI, 1994; ZAIDI et al, 2000).

A formação de bulbos a partir das estacas depende de fatores abióticos como a utilização de tratamentos químicos e de fatores intrínsecos à planta, como a disponibilidade de materiais de reserva nas bainhas para a formação dos novos bulbos (MARINANGELI & CURVETTO, 1997). Tratamentos químicos, como reguladores de crescimento, têm sido utilizados para aumentar o enraizamento das estacas de bainhas foliares, tendo em vista que a baixa ocorrência de bulbos com raízes é um dos problemas neste sistema de propagação (HANKS, 1993; TOMBOLATO, AZEVEDO, NAGAI, 1994).

Independente do método de enraizamento (*in vitro* ou *ex vitro*), os princípios morfofisiológicos são os mesmos (DECETTI, 2000). Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a formação de raízes pode ser dividida em três fases: indução, iniciação e alongamento das raízes. De acordo com Harbage, Stimart, Evert (1993), as duas primeiras fases são dependentes de auxina e a terceira fase é inibida pela presença da mesma. Entre as auxinas mais empregadas no enraizamento de estacas de diversas espécies, destaca-se o AIB pela sua maior resistência à degradação pela ação de raios solares e pela sua maior resistência ao ataque por ação biológica (TOFANELLI et al., 2002). Tombolato, Azevedo, Nagai, (1994) observaram que a utilização de 1000 ppm de AIB em estacas de bainha foliar de *Hippeastrum hybridum* induziu um aumento no número de raízes formadas, sem reduzir o comprimento das mesmas. Em estacas de bainhas foliares de *Lilium lancifolium*, o uso de 100 ppm de AIB e 100 a 300 ppm de ANA estimulou a formação de um maior número de bulbos (PARK, 1996).

Foram encontrados poucos trabalhos na literatura sobre o efeito de ANA sobre a estaquia de bainhas foliares. Entretanto, esta auxina é utilizada durante a fase de enraizamento na micropropagação de um grande número de espécies bulbosas, incluindo algumas amarilidáceas (GEORGE, 1996). Durante a estaquia de bainhas foliares em várias espécies, a utilização de ANA pode estimular a formação de bulbos (HARTMANN, KESTER, DAVIES, 1990). No entanto, ANA inibiu a formação de bulbos na micropropagação de *Hippeastrum* através de bainhas foliares (OKUBO, HUANG, KISHIMOTO, 1999; TOMBOLATO et al., 2001). Isto pode ser uma vantagem na estaquia, tendo em vista que a produção de um bulbo por estaca permite a formação de bulbos de maior tamanho, diminuindo o tempo necessário para que as plantas atinjam a maturidade reprodutiva (TOMBOLATO, AZEVEDO, NAGAI, 1994). Nos processos de micropropagação (TOMBOLATO et al., 2001) e na estaquia (TOMBOLATO, AZEVEDO, NAGAI, 1994) de *Hippeastrum hybridum*, o ANA induziu um maior número de raízes quando comparadas com AIA ou AIB.

A quantidade de substâncias de reserva contidas na bainha é o fator interno que mais influencia a taxa de propagação, pois afeta a formação de raízes adventícias e a fitomassa final dos bulbos (MARINANGELI & CURVETTO, 1997). Os bulbos são excelentes materiais para propagação devido à grande quantidade de reservas de carboidratos (LEOPOLD & KEIEDERMAN, 1975; BOYER, 1985). Entretanto, o aporte de reservas varia em função da posição da bainha dentro do

bulbo, sendo que as bainhas mais externas contêm as maiores quantidades (HARTMANN, KESTER, DAVIES, 1990). Em *Hippeastrum hybridum* foi observada a maior produção de bulbos e raízes em estacas obtidas das bainhas mais externas do bulbo (HUANG et al, 1990; TOMBOLATO, AZEVEDO, NAGAI, 1994). Em *Lilium speciosum*, a maior produção de bulbos observada com as estacas das bainhas mais externas foi correlacionada com o maior conteúdo de carboidratos totais nas bainhas (PARK, 1996). No entanto, Jintapakorn (1998) observou que a produção de bulbos nas bainhas variou em função da espécie, sendo maior nas estacas de bainhas mais internas de *Hippeastrum* sp e nas estacas de bainhas mais externas em *Hippeastrum hybridum*. A maior formação de bulbos e raízes nas bainhas internas também foi observada em estacas de bainhas foliares de *Bowiea volubilis* (COOK, CUNNINGHAM, VAN STANDEN, 1988) e em bainhas foliares de *Hippeastrum vittatum* (AMADOR et al., 1998).

De acordo com a literatura, a estaquia de dupla camada de bainhas foliares representa uma metodologia alternativa para a propagação de algumas espécies bulbosas nas quais a multiplicação vegetativa natural se torna inviável como técnica para a produção de mudas. Tendo em vista que *Hippeastrum aulicum* produz poucos bulbos por ano, foi realizado um estudo para verificar se a estaquia de dupla camada de bainhas foliares é viável como método de propagação para esta espécie. Para tanto, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de ANA e AIB sobre a indução de bulbos e produção de raízes em estacas de bainhas foliares provenientes das regiões mais próximas ao centro do bulbo e das regiões mais próximas à periferia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Bulbos da espécie *H. aulicum*, pesando $230 \pm 15\text{g}$ e com $7,6 \pm 0,9\text{ cm}$ de diâmetro, foram coletados na UCAD, SC. Depois de retiradas as raízes, folhas e resíduos de solo, os bulbos foram armazenados em sacos plásticos em ausência de luz à 15°C em geladeira, onde foram mantidos por 60 dias.

Após este período, foram retiradas as bainhas mais externas e desidratadas do bulbo e realizada a seqüência de cortes para obtenção das estacas conforme descrito por Hartmann, Kester, Davies (1990) e mostrado na Figura 5.

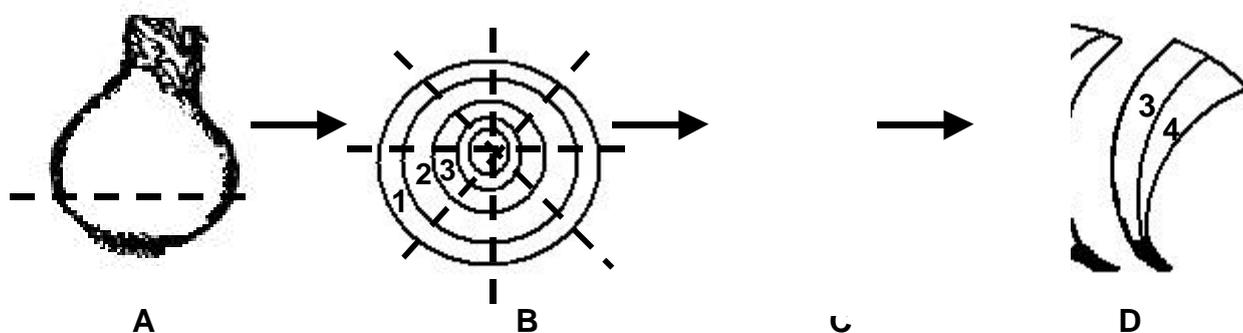


Figura 5 – Esquema utilizado para obtenção de estacas de dupla camada de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*: A – O bulbo foi cortado transversalmente e a parte superior foi eliminada; B – A parte inferior foi seccionada radialmente em fatias, C – Cada fatia foi separada em segmentos de dupla camada de bainha foliar, inseridas em uma porção do caule.

Foi obtida uma média de 30 estacas, com 2 cm de largura por 4 cm de comprimento, por bulbo. As estacas provenientes da região central e as da região periférica do bulbo foram mantidas separadas para verificar possíveis diferenças na produção de bulbos e raízes em função da posição em que foram retiradas do bulbo.

As estacas foram então lavadas com água destilada e desinfestadas em uma solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) por 20 minutos. Em seguida, as estacas foram tratadas durante 30 minutos com uma solução de metil 1-(butil carbamil) 2-benzimidazol carbamato (Benlate) a 0,1%(v/v) de acordo com o que foi recomendado por Marinangeli & Curvetto (1997).

Para este ensaio, foram testados 0; 50; 100; 500 ou 1000 ppm de ANA ou de AIB, em estacas provenientes das regiões periférica e central do bulbo. Para tanto, as estacas foram imersas durante alguns segundos na solução com ANA, AIB ou em água destilada no tratamento testemunha. Em seguida, as estacas foram colocadas em bandejas de polipropileno com células de 11 x 5 x 5 cm contendo o substrato comercial Plantmax[®] previamente autoclavado a 121 °C, por 30 minutos.

O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado, com 3 repetições de 8 estacas. As bandejas com as estacas foram mantidas em fitotron com temperatura de 25 °C, em ausência de luz durante 40 dias. Após este período, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência, o número de bulbos e o número e comprimento de raízes produzidas por estaca, provenientes da região central e da região periférica dos bulbos de *Hippeastrum aulicum*.

Os dados foram transformados em $\log(Y+1)$ e as médias foram analisadas através da análise da variância segundo Sokal & Rohlf (1995), onde as estacas provenientes da região periférica e da região central do bulbo, as auxinas ANA e AIB, nas concentrações de 50; 100; 500 ou 1000 ppm constituíram um fatorial 2 x 2 x 4 e após, contrastados com as médias do tratamento testemunha. A análise dos resultados foi efetuada através do programa STATGRAFI CS. Quando detectados efeitos significativos, a comparação de médias foi realizada pelo teste DMS, a 5% de probabilidade de erro.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sobrevivência das estacas de bainhas foliares de *H. aulicum* foi afetada pela posição em que em que estavam inseridas no bulbo, pela utilização, tipo e concentração da auxina utilizada. Foram observadas as maiores porcentagens de sobrevivência das estacas provenientes da região central do bulbo, sem a utilização de auxinas ou naquelas tratadas com 50 ppm de ANA ou AIB (Tabela 2).

Tabela 2 – Sobrevivência das estacas, porcentagem de enraizamento, número de raízes, porcentagem de bulbificação e número de bulbos por estaca de bainhas foliares de *Hippeastrum aulicum* provenientes da região periférica (P) e central (C) do bulbo, após 40 dias do plantio, quando tratadas com diferentes concentrações de ANA e AIB.

estaca			sobrevivência (%)	enraizamento (%)	raízes por estaca	comprimento das raízes (cm)	bulbificação (%)	bulbos por estaca
testemunha	C		100,00a	53,33a	1,12c	7,10a	46,66b	1,70a
	P		46,66d	46,66a	1,50b	4,11b	33,33b	1,10b
ANA ppm	50	C	91,67ab	16,67c	0,67d	1,24d	70,83a	1,32b
		P	25,00e	0,00	0,00	0,00	4,17e	0,33d
	100	C	62,67c	37,67b	1,17c	1,29c	21,00d	0,21de
		P	12,50f	4,17d	0,33d	1,80c	4,17e	0,04f
	500	C	46,66d	46,66a	4,01a	1,32c	4,17e	0,04f
		P	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1000	C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		P	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AIB ppm	50	C	79,17ab	4,17d	0,33d	0,60d	25,00c	0,67c
		P	8,33f	0,00	0,00	0,00	4,17e	0,33d
	100	C	66,67bc	8,33d	0,50d	0,81d	4,17e	0,04f
		P	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	500	C	4,17g	0,00	0,00	0,00	4,17e	0,08ef
		P	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1000	C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		P	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CV(%)			8,01	7,71	15,81	13,55	12,44	23,09

Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste DMS, a 5% de probabilidade de erro.

Com a utilização de 1000 ppm de ANA ou AIB, 100% das estacas morreram, independentemente da posição em que ocupavam no bulbo. O efeito fitotóxico das auxinas foi visível também nas estacas tratadas com ANA e AIB nas concentrações de 50, 100 e 500 ppm (Figura 6). Prasad & Chatuverdi (1993) observaram que o enraizamento de brotações de *Hippeastrum*, *in vitro* ocorreu sem a adição de auxinas. Isto significa que os níveis endógenos de AIA são suficientes para a produção de raízes. A adição de ANA ou AIB nas concentrações mais elevadas pode ter elevado o AIA endógeno a um nível fitotóxico, causando a morte das estacas de bainhas foliares de *H. aulicum*.

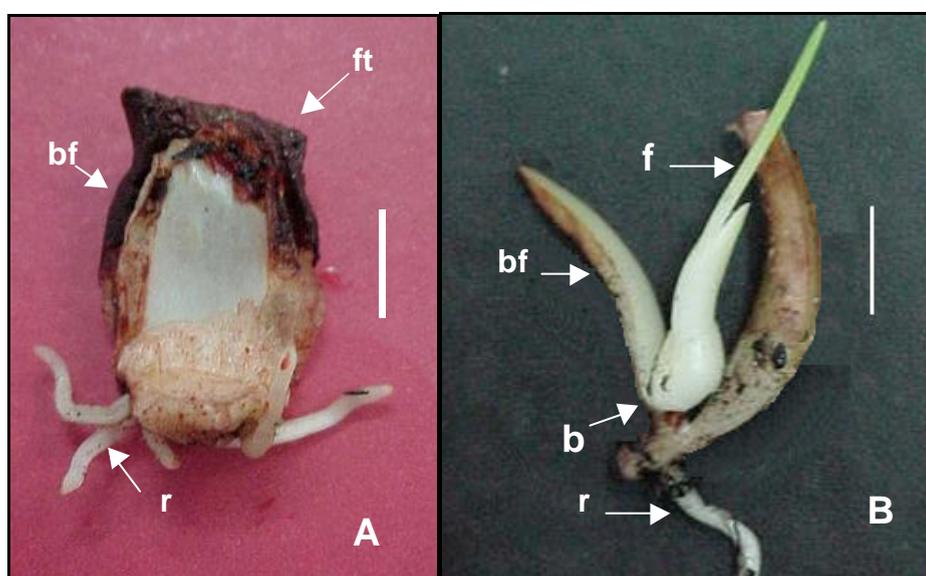


Figura 6 – Estacas de bainha foliar de *H. aulicum*, 40 dias após a transferência para substrato, em fitotron a temperatura de 25 °C, em ausência de luz: (A) Estaca tratada com 500 ppm de ANA; (B) Estaca sem a utilização de auxina. Legenda: b= bulbo, bf=bainha foliar, f=folhas, ft=fitotoxidez, r=raízes. Barra = 2 cm.

Os tecidos de bainhas foliares da espécie *H. aulicum* apresentaram uma maior sensibilidade ao AIB, tendo em vista que a utilização desta auxina causou as menores porcentagens de sobrevivência e produção de raízes ou bulbos (Tabela 2). Este resultado confirma os dados da literatura consultada em que o ANA é mais indicado para propagação de espécies bulbosas (HARTMANN, KESTER, DAVIES, 1990; GEORGE, 1996; ZAIDI et al., 2000). Liu et al. (1996) sugeriram que o mecanismo que regula a ativação gênica das enzimas que oxidam AIA endógeno, durante o enraizamento de hipocótilos de *Glycine max*, age mais

independentemente com adição de ANA do que de AIB, sendo mais efetivo no enraizamento. Assim, a variação nas respostas das estacas de bainha foliar de *H. aulicum* sugere que promotores e inibidores endógenos determinam em parte a natureza da interação com as auxinas aplicadas.

A maior porcentagem de estacas com raízes foi observada no tratamento testemunha e no tratamento com 500 ppm de ANA nas estacas de bainhas centrais (Tabela 2). No tratamento testemunha também foram observadas raízes de maior comprimento que aquelas produzidas nas estacas tratadas com auxina (Tabela 2 e Figura 7). Tombolato, Azevedo, Nagai (1994) verificaram a proliferação de um maior número de raízes de menor tamanho quando estacas bainhas de *H. hybridum* foram tratadas com 1000 ppm de ANA, quando comparados com a testemunha ou com a utilização de AIB na mesma concentração. No presente trabalho, com a concentração de 1000 ppm de ANA, ou AIB, ocorreu a morte das estacas, e nas menores concentrações ambas as auxinas provocaram a redução no comprimento das raízes. De acordo com Harbage, Stimart, Evert (1993), a inibição do crescimento das raízes com o uso de auxinas também é observada *in vitro*. Segundo este autor, as fases de indução e iniciação do enraizamento são dependentes de auxina e a fase de alongamento é inibida pela presença da mesma. Com base nos dados obtidos no presente trabalho, o menor tamanho das raízes observadas nas estacas de bainhas foliares de *H. aulicum* tratadas com ANA ou AIB foi ocasionado pelo efeito das concentrações das auxinas.



Figura 7 – Estacas de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum* provenientes da região central (I) e da região periférica (II) do bulbo, tratadas com 500 ppm de ANA (A) e sem a utilização de ANA (B), 40 dias após a transferência para substrato, em fitotron, a temperatura de 25 °C e em ausência de luz. Barra = 2 cm.

Com uso de 500 ppm de ANA nas estacas de bainhas centrais foi obtido o maior número de raízes por estaca (Tabela 2). A quantidade de raízes pode determinar a retomada do crescimento posterior, pois influi diretamente na capacidade de absorção de água e nutrientes. Apesar do maior crescimento das raízes no tratamento testemunha, o número reduzido de raízes produzido limita o volume de solo a ser explorado pelo sistema radicular. Este resultado indica a necessidade da utilizar auxinas para aumentar o número de raízes por estacas de bainha foliar para aumentar a eficiência das estacas quando transferidas ao campo.

As diferenças nas respostas das estacas provenientes de duas diferentes regiões do bulbo de *H. aulicum* não foram causadas apenas pela quantidade de reservas contidas nas bainhas como descrito por Park (1996) em *Lilium*. Sem o uso de auxina a produção foi maior nas estacas periféricas, sendo que possivelmente o maior aporte de substâncias de reserva destas tenha influenciado na formação das raízes. No entanto, com a utilização de 500 ppm de ANA, a maior produção de raízes na estaca de bainha central pode ter ocorrido devido à maior juvenilidade dos tecidos e maior capacidade de neoformação de órgãos, quando fornecido o estímulo apropriado.

A maior porcentagem de estacas com bulbos ocorreu com a utilização de 50 ppm de ANA. No entanto, sem a utilização de auxina foi obtida a maior quantidade

de bulbos por estaca. Tombolato, Azevedo, Nagai (1994) também observaram a redução no número de bulbos por estaca com o uso de auxinas. Segundo estes autores, um menor número de bulbos por estaca é interessante para que sejam obtidos bulbos de maior tamanho e assim diminuir o tempo necessário para que as plantas atinjam a maturidade reprodutiva. A maior produção de bulbos ocorreu nas estacas de bainhas da região central do bulbo. Estes resultados foram semelhantes aos observados por Cook, Cunningham, Van Standen (1988), Jintapakorn (1998) e Amador et al. (1998). Conforme discutido anteriormente, a maior formação de bulbos nas estacas de bainhas foliares mais internas é atribuída à maior juvenilidade dos tecidos.

Comparando-se o número de bulbos formados por planta com a multiplicação vegetativa natural (1,5 bulbos por ano) e os valores obtidos com a estaquia de dupla camada de bainha foliar (Tabela 2), conclui-se que a estaquia de bainhas foliares é uma prática viável para aumentar o número de propágulos de *Hippeastrum aulicum*. No entanto, as concentrações dos reguladores de crescimento utilizadas neste ensaio não mostraram-se efetivas para melhorar a propagação da espécie através da técnica de estaquia. Novos ensaios devem ser realizados com a aplicação destes reguladores de crescimento em diferentes concentrações, nos diferentes estádios de desenvolvimento das estacas.

Embora esta técnica de propagação vegetativa seja viável, observou-se uma grande incidência de fungos, apesar de terem sido tomadas medidas para diminuir a quantidade de contaminantes, como o uso de fungicida nas estacas e autoclavagem do substrato. Tombolato et al. (2001) também observaram que a grande problemática da propagação vegetativa por estacas de bainhas foliares são as perdas pelo apodrecimento das estacas ocasionadas pelo ataque de patógenos. Assim, é necessária a realização de novos estudos para o estabelecimento de uma assepsia mais efetiva no controle de patógenos para diminuir as perdas de estacas viáveis.

6. CONCLUSÕES

- O uso de AIB e ANA reduziu a sobrevivência das estacas de duplas camadas de bainhas foliares de *Hippeastrum aulicum*, provocando a morte de 100% das estacas na concentração de 1000 ppm;
- Os tratamentos com ANA e AIB reduziram o número de bulbos por estaca, mas aumentaram o número de raízes;
- ANA foi mais efetivo que AIB para formação de bulbos e raízes nas estacas de bainhas foliares;
- A porcentagem de estacas com bulbos foi maior no tratamento com 50 ppm de ANA e o maior número de raízes por estaca 500 ppm de ANA;
- Estacas de bainhas foliares provenientes da região central do bulbo apresentam maior sobrevivência, bem como maior produção de bulbos e de raízes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKEMA, H. Y. Vegetative propagation of daffodils by double-scaling. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 47, p. 193-199. 1975.

AMADOR, A. M., et al. Disinfection of *Hippeastrum vittatum* explants as a determining factor for large scale propagation with commercial aims in Cuba. **Revista del Jardín Botánico Nacional**, La Habana, v. 19, p. 103-111. 1998.

BOYER, C. D. Synthesis and breakdown of starch. In: NEYRA, C. A. **Biochemical basis of plant breeding**. Florida: CRC Press, 1985. v. 1, p. 133-153.

BRUNT, A. A. The production and distribution of virus-tested ornamental bulb crops in England: principles, practice and prognosis. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 164, p. 153-162. 1985.

COOK, E. L.; CUNNINGHAM, A.; VAN STANDEN, J. The tissue culture of an exploited medicinal plant, *Bowiea volubilis*. **South African Journal of Botany**, Pietermaritzburg, v. 54, p. 509-510. 1988.

DECETTI, S. F. C. **Propagação in vitro de *Annona glabra* L.** 2000. 101 f.. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: In Practice**. 2. ed. England: Exergetics, 1996. 1361p.

GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. p.331-353.

HANKS, G. R. *Narcissus*. In: DE HERTOOGH, A. & LE NARD, M. **The physiology of flower bulbs**. The Netherlands: Elsevier, 1993. p. 463 – 558.

HARBAGE, J. F.; STIMART, D. P.; EVERT, R. F. Anatomy of adventitious root formation in microcuttings of *Malus domestica* Borkh 'Gala'. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 118, n. 5, p. 680-688. 1993.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T. Propagation by specialized stems and roots. In: **Plant Propagation: principles and practices**, 5 ed., New Jersey: Prentice-Hall, p.429-458. 1990.

HUANG, C. W., et al. Importance of two scale in propagating *Hippeastrum hybridum* by twin scaling. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 42, n. (1-2), p. 141-149, 1990.

JINTAPAKORN, W. Growth and development of amaryllis bulb. **Thesis/Independent study abstract - Chiang Mai University**, Thailand, 1998. Disponível em: <<http://www.chiangmai.ac.th>>. Acesso em: 18 dezembro 2002.

LEOPOLD, A. C. & KEIEDERMAN, P. E. Tuber and bulb formation. In: FULLER, M. S. & LICHT, P. **Plant growth and development**. UK: MacGraw Hill Book Co. Lim., 1975. p. 337-345.

MARINANGELLI, P.; CURVETTO, N. Bulb quality and traumatic acid influence bulblet formation from scaling in *Lilium* species and hybrids. **Hortscience**, Alexandria, v. 32, n. 4, p. 739-731. 1997.

MOWAT, W. P. Methods of virus-indexing for virus-tested *Narcissus* stocks. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 177, p. 211-220. 1986.

OKUBO, H. *Hippeastrum* (Amaryllis) In: DE HERTOOGH, A. & LE NARD, M. **The physiology of flower bulbs**. The Netherlands: Elsevier. 1993. p. 321-334.

OKUBO, H.; HUANG, C. W.; KISHIMOTO, F. Effects of anti-auxins and basal plate on bulblet formation in scale propagation of amaryllis (*Hippeastrum x hybridum* hort.). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v. 68, n. 3, p. 513-518. 1999.

PARK, N. Effect of the temperature, scale position, and growth regulators on the bulblet formation and growth during the scale propagation of *Lilium*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 414, p. 257-262. 1996.

REES, A.; HANKS, G. R. The twin-scaling technique for *Narcissus* propagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 109, p. 211-216. 1980.

SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. **Biometry**. 3 ed. San Francisco: Freeman and Company, 1995. 887 p.

STANCATO, G. C. **Fisiologia do crescimento em *Hippeastrum hybridum* cv 'Apple Blossom'**: relações fonte:dreno. 1993. 52 f.. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

TOFANELLI, M. B. D., et al. Enraizamento de estacas lenhosa e semilenhosas de cultivares de ameixa com várias concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 24, n. 2, p. 509-513. 2002.

TOMBOLATO, A. F., et al. Micropropagação de *Hippeastrum hybridum* 'Apple Blossom' mediante escamas duplas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 7, n.1, p. 35-40. 2001.

TOMBOLATO, A. F.; AZEVEDO, C.; NAGAI, V. Effects of auxin treatments on *in vivo* propagation of *Hippeastrum hybridum* Hort. by twin scaling. **Hortscience**, Alexandria, v. 29, n. 8, p. 922. 1994.

ZAIDI, N., et al. Bulb and cormous monocotyledonous ornamental plants *In vitro*. Quarterly **Science Vision**, PK, v. 6, n. 1, p. 58-73. 2000.

CAPÍTULO 4 – MICROPROPAGAÇÃO DE *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb (Amaryllidaceae).

1. RESUMO

Através da micropropagação, é possível a produção de um grande número de mudas a partir de um mínimo de material utilizado como explante primário. Este aspecto é relevante para a exploração econômica de espécies nativas, pois evita a retirada de grandes quantidades de exemplares dos habitats naturais, auxiliado na sua preservação. Neste trabalho foram desenvolvidas metodologias para micropropagação de *Hippeastrum aulicum*. Para tanto, foram utilizados explantes de partes florais e explantes de segmentos de dupla camada de bainha foliar inseridos em uma porção do caule. Para assepsia, os bulbos foram imersos em água destilada a 54 °C por 30 minutos e os explantes de bainhas foliares foram desinfestados em solução com 1,0; 1,5; ou 2,0% de cloro ativo durante 15 ou 20 minutos. Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS, suplementado com 0,0; 0,2; ou 1,0 µM de ANA combinados com 0,2; 1,0 ou 4,0 µM de BAP. Para a multiplicação das brotações foi utilizado o meio de cultura MS suplementado com 1,0 µM de ANA e 10, 15 ou 30 µM de BAP. A utilização de explantes de bainhas foliares foi mais adequada que a utilização de explantes de partes florais, tendo em vista a elevada oxidação dos últimos. Não houve contaminação em nenhum dos tratamentos para assepsia das bainhas foliares, mas a sobrevivência dos explantes foi de aproximadamente 50%, sendo possivelmente influenciada negativamente pelo pré-tratamento em termoterapia. O melhor meio de cultura para indução de brotações nos explantes de bainhas foliares foi o MS com 1,0 µM de ANA e 4,0 µM de BAP e os tratamentos utilizados para multiplicação não diferiram significativamente. Resultados de análises dos explantes de bainhas foliares *in vitro* por CLAE e de estudos histológicos sugerem a participação de compostos fenólicos no processo morfogênico, que iniciou após o acúmulo dos mesmos nas células parenquimáticas próximas a superfície abaxial das bainhas.

2. ABSTRACT

Micropropagation of *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb (Amaryllidaceae)

The multiplication of a high number of plants from a minimal material used as primary explant is possible with the micropropagation. This feature is relevant for economical use of native species, because it avoids the collection of high quantities of exemplars from its natural habitats helping its preservation. Methodologies for micropropagation of *Hippeastrum aulicum* have been developed in this study. Additionally, floral explants and double-scale with a portion of the stem explants was used. For reason of disinfection, the bulbs were immersed in distilled water at 54 °C for 30 minutes and bulb scales explant were immersed in a solution with 1,0%; 1,5%; or 2,0% of active chlorine during 15 or 20 minutes. Explants were inoculated in MS culture media supplemented with 0,0 µM; 0,2 µM; or 1,0 µM of ANA combined with 0,2 µM; 1,0 µM or 4,0 µM of BAP. For shoot multiplication the MS culture media supplemented with 1,0 µM of ANA and 10 µM, 15 µM, or 30 µM of BAP was used. The utilization of bulb scale explants was the most suitable than the utilization of floral explants itself, having in sight the elevated oxidation of the last ones. There were not contamination with the disinfection treatment of the bulb scales, but the explant survival rate was approximately 50%, being possibly negatively influenced by pretreatment in thermotherapy. The best culture media for shoot induction in bulb scale explants was the MS with 1,0 µM of ANA and 4,0 µM of BAP and the treatments used for multiplication did not differ significantly. Results of analysis by HPLC of the bulb scale cultured *in vitro* and results of anatomical investigation suggested the involvement of phenolic compounds with the morphogenic process, that starts after the increase of these compounds into the parenchymal cells near the scales abaxial surface.

3 . INTRODUÇÃO

Os avanços conquistados no campo da fisiologia vegetal nos últimos 40 anos proporcionaram o desenvolvimento de tecnologias de propagação alternativas aos métodos convencionais através da cultura de tecidos. Esta técnica de propagação vegetativa envolve a seleção da fonte de explante, desinfestação dos tecidos e a introdução dos mesmos em ambiente asséptico em um meio de crescimento (VASIL & THORPE, 1994). Tendo em vista que as plantas são obtidas em ambiente asséptico, esta técnica possui grande aplicação e aceitação mundial por possibilitar o intercâmbio de material vegetal isento de patógenos entre os países, evitando assim, barreiras fitossanitárias.

A micropropagação permite a produção massal de plantas a partir de um mínimo de material utilizado como explante primário e é de particular importância para espécies onde métodos de propagação convencionais são pouco eficientes. Do ponto de vista ecológico, a cultura de tecidos é relevante na conservação *ex situ* de espécies nativas raras e ameaçadas de extinção ou recalcitrantes, bem como, evitando a retirada de grandes quantidades de exemplares dos habitats naturais para exploração econômica. Na floricultura, sua aplicação também é de grande interesse, pois as variações somaclonais geradas por efeitos dos componentes do meio podem dar origem a plantas com cores e formas raras, as quais possuem alto valor comercial.

Apesar de as monocotiledôneas serem consideradas difíceis de serem cultivadas *in vitro*, houve um aumento no número dessas plantas micropropagadas nas últimas décadas (ZAIDI et al., 2000). Muitas destas monocotiledôneas são representadas por bulbosas ornamentais de importância econômica (SMITH, 2000). Para plantas pertencentes ao gênero *Hippeastrum*, que apresentam baixa produção de propágulos vegetativos durante o ciclo de crescimento (STANCATO, 1995), a micropropagação pode ser vantajosa por proporcionar a obtenção de plantas em larga escala, em curto espaço de tempo. No entanto, foram encontrados poucos trabalhos publicados envolvendo cultura de tecidos de plantas pertencentes ao gênero *Hippeastrum* e nenhum focalizando a espécie *Hippeastrum aulicum*. Entretanto, alguns trabalhos têm demonstrado que muitos protocolos desenvolvidos para espécies exóticas podem ser adaptados para espécies nativas, particularmente no que se refere a composição do meio de cultura e fonte de explantes.

O meio de cultura comumente utilizado para micropropagação de plantas bulbosas é o MS, ou MS suplementado com sulfato de adenina e ácido ascórbico (MIELKE & ANDERSON, 1989; PRASAD & CHATUVERDI, 1993; MARINANGELI, et al., 1998; SAKER, RADY, EL-BAHR, 1998), e uma fonte extra de fósforo como o fosfato de sódio hidratado (MIELKE & ANDERSON, 1989; GEORGE, 1996). Alguns trabalhos têm relatado a necessidade de suplementar o meio com auxinas para indução da organogênese em explantes de bainha foliar de *Hippeastrum* sp. (MII, MORI, IWASE, 1974; HUSSEY, 1975). Entretanto, em *Hippeastrum hybridum* isto não foi observado por TOMBOLATO et al. (2001). Estes autores observaram que o uso de citocininas estimulou a organogênese nesta espécie. Castro & Matthes (1987) concluíram que o balanço de auxinas e citocininas foi mais efetivo para a formação de brotações, calos ou bulbilhos em explantes de bainha foliar do que o efeito isolado destes reguladores de crescimento. Os reguladores de crescimento ANA nas concentrações de 0,1 a 4,0 mg.L⁻¹ e BAP à 1,0 a 16,0 mg.L⁻¹ são os mais utilizados para a indução de brotações ou bulbos (GEORGE, 1996). Para a indução da organogênese e embriogênese em plantas bulbosas tem sido utilizado 2,4 – D, ANA, Kin e BAP em meio MS (GEORGE, 1996; ZAIDI et al., 2000). Prasad & Chatuverdi (1993) obtiveram alta produção de bulbos de *Hippeastrum* sp em meio contendo BAP e ANA, suplementado com sulfato de adenina e ácido ascórbico.

Muitas espécies bulbosas demonstram habilidade em regenerar brotações, bulbos ou gemas adventícias a partir de explantes constituídos por folhas, escapo floral e ovário (GEORGE, 1996). Para liliáceas, iridáceas e amarilidáceas, incluindo *Hippeastrum* sp., partes florais (pedúnculo, segmentos da inflorescência, carpelo, antera, etc.) também podem ser utilizadas como fonte de explantes para cultura *in vitro* (BELL, 1973; HUSSEY 1975; SEABROOK & CUMMING, 1977; O'ROURKE et al., 1991; PIERIK, 1991 ; ZAIDI et al., 2000). A utilização desta fonte de explante tem sido vantajosa em algumas espécies devido à rápida regeneração de brotações a partir de mínimo material vegetal (BUNN & DIXON, 1997). Além disso, a introdução de inflorescências *in vitro* é um método não destrutivo para obtenção de explantes permitindo a preservação da planta matriz já que são utilizadas estruturas que se formam sazonalmente na planta. Este aspecto é de fundamental relevância para conservação de plantas nativas ameaçadas de extinção.

Explantes constituídos por uma ou duas camadas de bainhas foliares inseridas em um segmento do caule são os mais comumente utilizados na

micropropagação de plantas bulbosas (MII, MORI, IWASE, 1974; OYAMADA, 1974; HUSSEY 1975; YANAGAWA & SAKANISHI, 1977). Para espécies do gênero *Hippeastrum*, explantes compostos de duas camadas de bainhas foliares são mais responsivos que os de uma única camada (GEORGE, 1996). Segundo este autor, o tecido meristemático localizado entre as camadas é competente para regenerar novas brotações, sendo danificado quando estas são separadas. Por isso, é necessário manter as camadas unidas quando são utilizados explantes da bainha foliar.

Alguns trabalhos têm relatado o início da diferenciação a partir de células localizadas nos tecidos próximos a epiderme das bainhas foliares em muitas espécies bulbosas (KROMER & KUKUCZANKA, 1992; AARTRIJK & BLOMBARNHOORN, 1993; VIDOR, 1995). Em Amaryllidaceae, a capacidade regenerativa é alta sobre a superfície abaxial das bainhas foliares (GEORGE, 1996). Descrições da origem da diferenciação de órgãos em explantes de *Hippeastrum aulicum* não foram encontradas na literatura consultada.

O estabelecimento de uma cultura asséptica é a fase mais crítica da micropropagação. Os meios de cultura são ricos em compostos orgânicos como açúcares, aminoácidos e vitaminas e isso disponibiliza condições favoráveis para o desenvolvimento de bactérias, fungos e outros microorganismos (GEORGE, 1996). Para explantes provenientes de bulbos, este fator se torna mais problemático tendo em vista a alta taxa de contaminação destes órgãos (VIDOR, 1997).

A efetividade da desinfestação do explante é dependente do tipo e idade do material utilizado, concentração do desinfestante e tempo de exposição (SMITH, 2000). Os desinfestantes comumente utilizados incluem etanol, hipoclorito de cálcio, hipoclorito de sódio e cloreto de mercúrio (HARTMANN, KESTER, DAVIES, 1990; VASSIL & THORPE, 1994). As respostas à assepsia variam conforme o tipo de tecido, entretanto, a super exposição ao desinfestante freqüentemente causa morte das células. Assim, são necessários estudos para definir os desinfestantes, concentrações e tempo de exposição mais apropriados para os diferentes tipos de tecidos.

A imersão do bulbo em água à 40-50 °C, durante uma a três horas, tem sido amplamente utilizada como técnica de assepsia para introdução deste material *in vitro* (GEORGE, 1996). A termoterapia apresenta vantagens quando comparada aos tratamentos químicos, como a eliminação de patógenos endógenos e por não deixar

resíduos (VIDOR, 1997; LANGENS-GERRITS et al., 1998). Entretanto, a termoterapia pode inibir as respostas dos explantes *in vitro* (BERGOÑON et al., 1993; VIDOR, 1997), variando em função da condição fisiológica da planta, tamanho, teor de umidade e idade do tecido, nível de dormência, constituição genética e outros (LANGENS-GERRITS et al., 1998).

A morte dos tecidos é uma das causas da ausência de resposta dos explantes *in vitro* e isto é freqüentemente observado quando é utilizada uma metodologia inadequada para assepsia do material. Segundo Chen & Lin (1998), a viabilidade de vários tecidos pode ser verificada através do teste de tretrazólio. Este teste é normalmente utilizado para determinar a viabilidade em sementes. Através deste teste, substâncias provenientes do processo de respiração transferem íons de hidrogênio para o indicador cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio ou brometo de tetrazólio, reduzindo-o a formazan. Como este produto é insolúvel ele permite a distinta visualização entre as células vivas, as quais adquirem coloração vermelha e as células mortas que permanecem com a cor natural (BRASIL, 1992).

Outro problema observado no estabelecimento da cultura *in vitro* é a injúria aos tecidos causada pela oxidação fenólica muito comum em espécies monocotiledôneas e particularmente em espécies tropicais introduzidas *in vitro* (GEORGE, 1996; SMITH, 2000). Em *Hippeastrum hybridum*, a pigmentação violácea que se manifesta nos tecidos excisados é causada pela formação de substâncias fenólicas (SANIEWSKI, URBANEK, PUCHALSKI, 1992; SANIEWSKA & SANIEWSKI, 1992; TAIPO, 1993; SANIEWSKA & BUDZIANOWSKI, 1997; SANIEWSKA & DYKI, 1997).

Os compostos fenólicos estão presentes nos tecidos das plantas e sua estrutura consiste basicamente de um grupo hidroxila ligado a um anel benzênico. Quando o tecido é excisado, ou quando sofre ataque de patógenos, estes fortes agentes redutores reagem com enzimas resultando na oxidação do grupo hidroxila e formação de quinonas e água (GEORGE, 1996). Este processo de ligação do hidrogênio com proteínas inibe a atividade enzimática e leva a célula a morte. Não apenas o produto desta oxidação, mas também os próprios compostos fenólicos podem inibir a atividade enzimática (GEORGE, 1996). A morte das células adjacentes ao ferimento é um mecanismo de defesa das plantas para impedir o avanço da injúria (FOSKET, 1994). É possível remover estes compostos realizando

rigorosa lavagem em água e repetir a lavagem com antioxidantes como o citrato ou ascorbato, ou adicionando carvão ativado ao meio de cultura (GEORGE, 1996).

Apesar de alguns estudos relatarem o efeito negativo dos compostos fenólicos sobre a proliferação de células e tecidos de plantas introduzidas *in vitro*, outros trabalhos descrevem o oposto. Lorenzo et al. (2001) observaram que em culturas de cana-de-açúcar *in vitro*, o período de maior proliferação de brotações foi precedido por um período de maior excreção fenólica, indicando um envolvimento dos mesmos na regulação do crescimento em plantas.

O objetivo deste trabalho foi estudar o processo de propagação de *Hippeastrum aulicum*, *in vitro* e as alterações morfogenéticas decorrentes deste processo propagativo. Para tanto, foram avaliados os efeitos de diferentes níveis de ANA e BAP na indução e multiplicação de brotações sobre explantes provenientes de partes florais e de bainhas foliares. Também foram realizados tratamentos para a assepsia dos explantes de bainhas foliares, tendo em vista o alto grau de contaminação do material e aplicado o teste de tetrazólio para verificar a viabilidade dos explantes após a assepsia. Alguns aspectos inerentes à origem do processo organogênico foram avaliados através de estudos histológicos e através da análise dos compostos produzidos pelos tecidos em cultura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

Bulbos de *H. aulicum* com peso médio de 220 g e diâmetro de 7,10 cm e inflorescências em pré-antese foram coletadas na UCAD, localizada no município de Florianópolis, Santa Catarina.

Após serem retiradas as raízes, as folhas e os resíduos de solo dos bulbos, estes foram pesados e os seus diâmetros mensurados. Em seguida, foram acondicionados em sacos de polietileno e armazenados sob temperatura de 15 °C em geladeira, durante 60 dias.

4.2. Obtenção e assepsia dos explantes de partes florais

Para assepsia das inflorescências, os botões florais ficaram imersos em solução de hipoclorito de sódio, a 1% de cloro ativo, durante meia hora. Em câmara de fluxo laminar, os botões foram abertos com auxílio de bisturi e separadas pétalas, estigmas, estiletos, ovários e anteras. As pétalas foram cortadas em segmentos medindo 1 x 1 cm. Estiletos e estigmas foram cortados em segmentos de 1 cm de comprimento e os ovários foram divididos transversalmente em duas partes.

Ainda na câmara de fluxo laminar, foi feita uma nova assepsia dos explantes em solução de hipoclorito, a 1% de cloro ativo, e Tween 20 (1 gota por 100 mL da solução), durante 20 minutos, sob agitação constante, através do emprego de *airlifting*.

Após a assepsia os explantes de partes florais foram inoculados em 50 mL de meio MS (Tabela 3), sem adição de reguladores de crescimento, em frascos com capacidade de 300 mL. Os explantes de pétalas foram inseridos com um terço do seu comprimento no meio de cultura. Os demais explantes de partes florais foram colocados longitudinalmente sobre o meio de cultura.

Tabela 3 – Composição (mg.L⁻¹) do meio de cultura de Murashige & Skoog (1962):

	NH ₄ NO ₃	1650,0
	KNO ₃	1900,0
Macronutrientes	CaCl ₂ .2H ₂ O	440,0
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0
	KH ₂ PO ₄	170,0
	H ₃ BO ₃	6,2
	MnSO ₄ .7H ₂ O	22,3
	KI	0,83
Micronutrientes	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Fonte de ferro	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,25
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Vitaminas e compostos orgânicos	Mioinositol	100,0
	Tiamina HCl	0,1
	Piridoxina HCl	0,5
	Ácido nicotínico	0,5
	Glicina	2,0
Fonte de carbono	Sacarose	30000
	Ágar	6000

As culturas foram mantidas em sala de crescimento no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal do Centro de Ciências Agrárias, UFSC, na ausência de luz, a uma temperatura de 25 ± 2 °C, durante 30 dias.

4.3. Obtenção, assepsia e viabilidade dos explantes de camadas de bainhas foliares

Tendo em vista que os bulbos são materiais vegetais que apresentam alto grau de contaminação, foram realizados ensaios para determinar o método de assepsia para a introdução de explantes de camadas de bainhas foliares de *H. aulicum*, *in vitro*. Foi avaliada a porcentagem de explantes não contaminados e viáveis, por tratamento. Para o ensaio, os bulbos, depois de retiradas as camadas secas de bainhas foliares (túnica), foram colocados em solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo), por 30 minutos e depois transferidos para frascos contendo água destilada e colocados em banho-maria a 54 °C por meia hora, conforme metodologia descrita por George (1996).

Em câmara de fluxo laminar, os bulbos foram colocados em álcool 70% por 30 segundos e após, em uma solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por 20 minutos. Posteriormente, os bulbos foram seccionados em explantes de dupla camada de bainha foliar medindo 2,0 cm de comprimento por 1,0 cm de largura, presas a uma porção do caule (Figura 8).

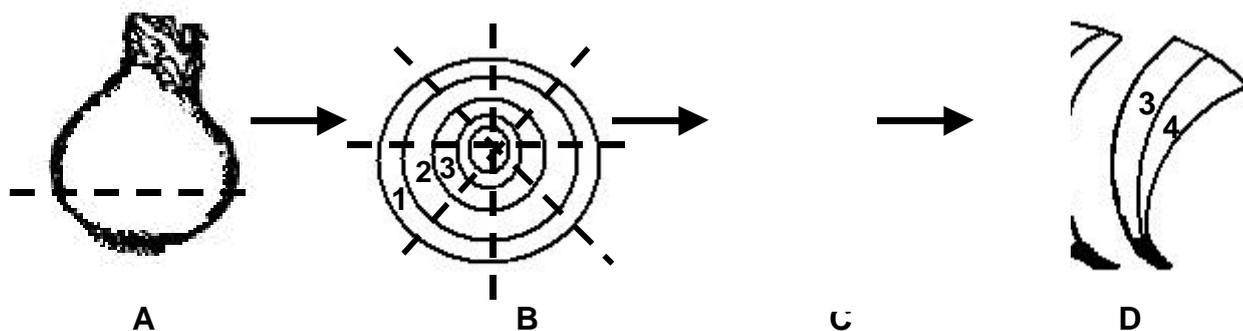


Figura 8 – Esquema utilizado para a obtenção de explantes de dupla camada de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*: A – O bulbo foi cortado transversalmente e a parte superior foi eliminada; B – A parte inferior foi seccionada radialmente em fatias, C – Cada fatia foi separada em segmentos de dupla camada de bainha foliar, inseridas em uma porção do caule.

Após, os explantes foram imersos em solução de hipoclorito de sódio nas concentrações 1,0; 1,5; ou 2,0% de cloro ativo e Tween 20 (1 gota por 100 mL). Os tempos de exposição dos explantes aos tratamentos para desinfestação foram 15 e 20 minutos para cada concentração testada. Após a realização do processo de desinfestação, os explantes foram lavados por três vezes em água destilada deionizada e autoclavada para eliminação do excesso das soluções desinfestantes.

Após a assepsia, os explantes de bainhas foliares foram inoculados em 50 mL de meio MS (Tabela 3), sem adição de reguladores de crescimento, em frascos com capacidade de 300 mL. Os explantes de bainha foliar foram inoculados com o segmento do caule em contato com o meio. Os frascos com as culturas foram mantidos em sala de crescimento no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal do Centro de Ciências Agrárias, UFSC, na ausência de luz, à temperatura de 25 ± 2 °C durante 30 dias.

Para verificar a viabilidade dos explantes de bainhas foliares, depois de 90 dias da assepsia, foi utilizado o teste de tetrazólio, conforme metodologia utilizada por Chen & Lin (1998) para verificar a viabilidade em folhas de *Syzygium*. Para tanto, foram utilizados explantes provenientes do ensaio de assepsia, que não apresentaram resposta morfogênica aos 90 dias e uma amostra de 5 g de tecido de bainha foliar retirada de um bulbo intacto. As amostras foram imersas em uma solução de brometo de tetrazólio a 1,0% e colocadas em vácuo para infiltração da solução nos tecidos. O material foi mantido sob proteção da luz para evitar a reação de redução da solução.

Após 24 horas em solução, foram comparadas as colorações dos tecidos dos explantes e da amostra retirada do bulbo, sendo este último considerado padrão para determinar a viabilidade dos demais.

4.3.1. Delineamento experimental e avaliações

O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado. Os parâmetros avaliados foram as porcentagens de explantes viáveis (não contaminados e vivos). Os dados foram transformados em log (Y+1) e a análise dos resultados foi efetuada segundo Sokal & Rohlf (1995), através do programa STATGRAFICS.

As três concentrações de desinfestante e os dois tempos de exposição dos tecidos constituíram em um fatorial 3 x 2. Foram utilizadas 9 repetições por tratamento sendo cada repetição constituída por um frasco com dois explantes. As diferenças entre as médias foram analisadas pelo F-teste através da análise de variância.

4.4. Indução e multiplicação de brotações em explantes de bainhas foliares de *Hippeastrum aulicum* micropropagadas

Neste ensaio foram avaliados os efeitos de ANA e BAP na indução e multiplicação de brotações, apenas com a cultura de explantes de bainhas foliares. Não foi possível dar prosseguimento ao experimento com explantes de partes florais devido à alta oxidação observada durante a fase de estabelecimento e a pouca disponibilidade de material.

4.4.1. Indução de brotações sobre os explantes primários

Após 30 dias em cultura em meio MS, os explantes de bainhas foliares foram transferidos para meio MS suplementado com 170 mg. L⁻¹ de fosfato de sódio monohidratado e 34 mg. L⁻¹ de sulfato de adenina, conforme recomendado por Mielke & Anderson (1989) e diferentes concentrações de ANA e BAP (Tabela 4), para induzir gemas vegetativas.

Tabela 4 – Concentrações (μM) de ANA e de BAP utilizadas em meio de cultura MS para a indução de gemas vegetativas em explantes de bainhas foliares de *Hippeastrum aulicum*.

Meios	ANA (μM)	BAP (μM)
1	0,0	0,2
2	0,0	1,0
3	0,0	4,0
4	0,2	0,2
5	0,2	1,0
6	0,2	4,0
7	1,0	0,2
8	1,0	1,0
9	1,0	4,0

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,7. Após, alíquotas de 50 mL dos meios de cultura foram colocados em frascos com capacidade de 300 mL e em seguida autoclavados à 121 °C, por 15 minutos.

Os frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, do Centro de Ciências Agrárias, UFSC, em ausência de luz e em temperatura de 25 ± 2 °C. Depois de 30 dias, os explantes foram transferidos para ambiente com fotoperíodo de 16 horas de luz, a uma radiação luminosa de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 ± 2 °C. A cada 30 dias foi feita a renovação do meio e aos 90, 120, 150 e 210 dias foi avaliada a porcentagem de explantes com calos, o número de brotações, de bulbos e de raízes por explante em cada tratamento.

4.4.2. Multiplicação das brotações

Após 210 dias da inoculação nos meios de cultura com ANA e BAP, as brotações obtidas foram individualizadas e transferidas para meio de cultura MS suplementado com 1 μM de ANA e 4 μM de BAP, para multiplicação das brotações.

Após 60 dias as brotações foram transferidas para o meio de cultura MS, com 10; 15 ou 30 μM de BAP e 1 μM de ANA. Foi avaliado o número de brotações, de bulbos e de raízes por explante, a cada 30 dias quando era realizada a transferência para os novos meios de cultura.

4.4.3. Delineamento experimental e avaliações

O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado. Os parâmetros avaliados foram as porcentagens de explantes com calos, número de brotações, número de raízes e número de bulbos por explante. Os dados foram transformados em $\log(Y+1)$ e a análise dos resultados foi efetuada segundo Sokal & Rohlf (1995), através do programa STATGRAFICS.

Na fase de indução de brotações, foram utilizadas quatro repetições constituídas por dois frascos contendo dois explantes cada. As diferenças entre as médias foram verificadas através da análise da variância em que as concentrações de ANA e BAP constituíram um fatorial 3 x 3. Na fase de multiplicação em meio com 1 μM de ANA e 4 μM de BAP, foram empregadas quatro repetições constituídas por dois frascos contendo dois explantes cada e as diferenças entre as médias obtidas antes e após a transferência de meio de cultura foram analisadas através do teste-t. Para multiplicação de brotações em meio de cultura com 1 μM de ANA e com 10, 15 ou 30 μM de BAP foram utilizadas nove repetições constituídas por dois frascos com dois explantes cada. As diferenças entre as médias dos três tratamentos foram verificadas através da análise de variância. Quando detectados efeitos significativos, a comparação de médias foi realizada pelo teste DMS.

4.5. Análise de compostos fenólicos formados nos explantes de ovário e de bainhas foliares de *Hippeastrum aulicum*, durante a propagação *in vitro*.

A intensa produção de pigmentos violáceos, associada pela literatura à formação de compostos fenólicos, foi observada nos explantes de bainhas foliares e de partes florais, *in vitro*. A formação de compostos fenólicos antecedeu a oxidação e morte dos explantes de partes florais e a morfogênese nos explantes de bainhas foliares. Para verificar a relação dos ácidos fenólicos presentes nos tecidos dos

explantes com as respostas observadas, realizou-se a análise qualitativa destes compostos em CLAE através da metodologia adaptada de Maraschin et al. (2001).

4.5.1. Coleta de amostras e extração dos compostos fenólicos

Foi coletado 1,0 g de tecido de explantes de bainhas foliares, cultivados em meio MS suplementado com 1 μM de ANA e 4 μM de BAP, e 1,0 g de tecido de explantes de ovário, cultivados em meio MS, após 30 dias da detecção visual de pigmentação violácea nos tecidos amostrados. Adicionalmente, coletou-se 1,0 g dos tecidos de bainhas foliares com a coloração natural provenientes de bulbo intacto. Em cada uma das três amostras de tecido, foram adicionados 10 mL de solução extratora de acetato de etila a 4°C, incubando-se por 30 minutos. Em seguida, o material foi macerado com auxílio de gral e pistilo e incubado em solução extratora por 3 horas, em escuro, a 4°C. Após este período, a fração organosolvente foi coletada por filtração e transferida para estufa a 50°C, para evaporação do extrator. O extrato concentrado foi armazenado (-18°C) até posterior análise do conteúdo de compostos fenólicos por cromatografia líquida.

4.5.2. Análise de ácidos fenólicos por cromatografia líquida

Para a análise da composição de ácidos fenólicos, as frações organosolventes concentradas foram ressuspensas em volume mínimo de metanol (MeOH) 70% (ca. 300 μL) e filtradas (0,22 μm). Alíquotas de 10 μL da amostra foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC – 10A), equipado com coluna C18 (Shim-packCLC-ODS, 25 cm x 4,6 mm \varnothing) e detector espectrofotométrico UV – visível operando em dupla leitura (Ch1 = 280 nm , Ch2 = 225 nm). A eluição foi isocrática, com fluxo de 0,8 mL por minuto, utilizando-se $\text{H}_2\text{O}:\text{AcOH}:\text{ } \zeta - \text{BuOH}$ (350:1:10, v/v/v) como fase móvel. A identificação dos compostos de interesse foi feita com base nos tempos de retenção obtidos a partir da análise de amostras padrões, sob as mesmas condições experimentais. Os resultados foram expressos como equivalentes ao ácido gálico utilizado como curva padrão. A quantificação dos ácidos fenólicos foi feita calculando-se a integral da área dos picos correspondentes, atribuindo-se à área total do cromatograma o valor de 100%.

4.6. Análises histológicas

Através de análises histológicas, foram estudadas as mudanças anatômicas nos tecidos de bainha foliar de *H. aulicum in vitro*, que culminaram na formação de calos, com o objetivo de identificar a origem do processo de morfogênese. Para tanto, foram utilizados explantes de bainhas foliares após 10, 15, 60 e 90 dias da inoculação nos meios de cultura com ANA (0,0; 0,2 e 1,0 μM) e BAP (0,2; 1,0 e 4,0 μM) e explantes de bainhas foliares antes da inoculação nos meios de cultura. Os tecidos foram fixados em uma solução de glutaraldeído 2,5% e em solução tampão fosfato composta de fosfato de sódio monobásico monoidratado (7,73 g.L^{-1}) e fosfato de sódio dibásico heptaidratado (38,66 g.L^{-1}) na proporção de 1:9 (v/v), segundo técnica de Johansen (1940). Os tecidos permaneceram nesta solução por 24 horas sob vácuo em um dessecador.

O material foi lavado na solução tampão, para então ser desidratado em série etanólica conforme Johansen (1940): etanol 30% (0,5 hora), 50% (0,5 hora), 70% (1 hora), 80% (1 hora), 90% (2 horas), 96% (2 horas), 100% (12 horas).

Após a desidratação, o material foi infiltrado e incluído em parafina histológica conforme metodologia proposta por SASS (1951). Para penetração do solvente orgânico de parafina nos tecidos, o material foi colocado em uma solução de etanol absoluto e xilol (3:1, v/v) por duas horas, depois em etanol absoluto e xilol (1:1, v/v) por duas horas, etanol absoluto e xilol (1:3, v/v) por duas horas, e finalmente em xilol 100% por 4 horas.

A inclusão do material em parafina foi feita através da série: xilol-parafina (3:1, v/v) por duas horas, xilol-parafina (1:1, v/v) por duas horas xilol-parafina (1:3, v/v) por cinco horas, e parafina por 12 horas, mantidas em estufa a 60 °C.

Quando completada a série, foi feita a inclusão definitiva em parafina para deixar a peça incrustada em um bloco sólido e possibilitar a realização dos cortes de 10 μm de espessura em micrótomo rotativo (Reichert Jung modelo 1130).

Os cortes foram colados em porta objeto com adesivo de Binsen e colocados sobre superfície aquecida para distender a parafina. Após a distensão o material foi colocado para secar em temperatura ambiente por 24 horas para que os cortes ficassem aderidos ao porta-objeto.

Após esta etapa, o material foi imerso em xilol por 30 minutos para depois ser re-hidratado em série para hidratação (100, 90, 80, 70 °GL), em banhos sucessivos

de 20 minutos. O material foi corado em Astrablau 1% (9:1) ou Safranina e *fast green* (SASS, 1951) por 15 minutos.

Após a coloração, foi feita a desidratação do material através da imersão em etanol (70, 80, 90 e 100 °GL), finalizando com xilol, em banhos sucessivos de 20 minutos para eliminar os restos de parafina.

Para montagem dos cortes adicionou-se uma gota de Bálsamo do Canadá, segundo técnicas propostas por Kraus & Arduin (1997), e colocou-se a lamínula evitando a formação de bolhas de ar.

Após a secagem do material foram feitos registros fotográficos com o auxílio de um fotomicroscópio da marca LEICA em aumento que possibilitasse a visualização das estruturas.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Assepsia e viabilidade dos explantes de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*

Os explantes de bainhas foliares de *Hippeastrum aulicum*, não apresentaram contaminações quando foram utilizadas as concentrações de cloro ativo de 1,0% ou 2,0% durante 15 ou 20 minutos de exposição. Entretanto, apesar de não ter ocorrido contaminação, os explantes que não diferenciaram até os 90 dias, também não apresentaram viabilidade evidenciada pela não pigmentação nos tecidos, após serem submetidos ao teste de tetrazólio (Figura 9).

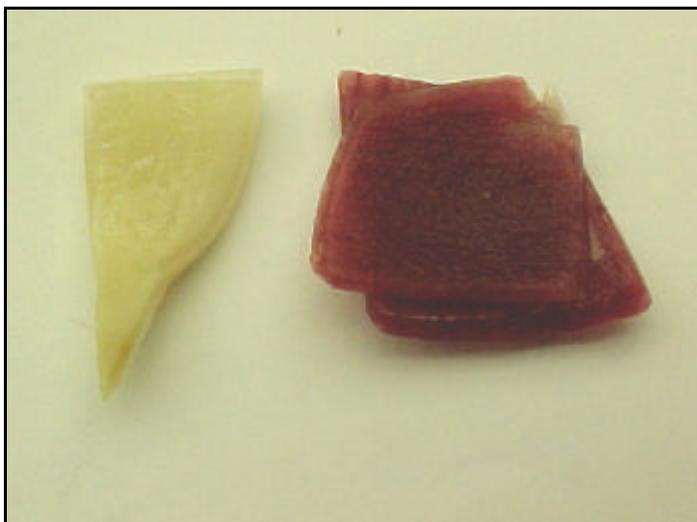


Figura 9 – Padrões de viabilidade de tecidos de bainhas foliares de *H. aulicum* após 12 horas em solução de brometo de tetrazólio: A – Tecidos provenientes de explantes mantidos por 90 dias em meio de cultura MS e que não diferenciaram; B – Tecidos viáveis provenientes do bulbo intacto.

Os resultados demonstraram que aproximadamente 50% dos explantes se encontravam inviáveis aos 90 dias da inoculação (Tabela 5). Altas concentrações e períodos prolongados de exposição dos tecidos ao desinfestante acarretam na menor sobrevivência do explante (VIDOR, 1997). Isto ocorre devido a forte propriedade oxidante do hipoclorito quando absorvido pelos tecidos do explantes, que induz a descarboxilação de ácidos orgânicos como aminoácidos e AIA presentes no meio de cultura (KANEKO & MOROHASHI, 2003). Entretanto, no presente trabalho não houve influência da concentração da solução de hipoclorito ou tempo de exposição sobre a porcentagem de sobrevivência dos explantes (Tabela 5). A falta de correlação destes fatores com a morte dos explantes é evidenciada pelas maiores porcentagens de sobrevivência dos mesmos, apesar de não

significativas, com a utilização de hipoclorito nas maiores concentrações e períodos de exposição (Tabela 5).

Tabela 5 - Porcentagem de sobrevivência de explantes de *H. aulicum*, após 90 dias da inoculação em meio MS:

cloro ativo(%)	Tempo de exposição (min.)	Sobrevivência (%)
1,0	15	50,00 ns
1,0	20	44,44ns
1,5	15	55,55ns
1,5	20	61,11ns
2,0	15	61,11ns
2,0	20	61,11ns
CV (%)		22,11

A morte dos explantes observada neste trabalho pode estar associada ao pré-tratamento dos bulbos em água a 54 °C. Vidor (1997), observou que apesar de a imersão de explantes de bainhas foliares de *Hyacinthus*, *Tulipa*, *Narcissus* e *Iris* em água a 54 °C por uma hora, ter sido efetiva no controle da contaminação, a termoterapia reduziu drasticamente a capacidade de regeneração dos explantes. O efeito negativo da termoterapia também foi observado por Bergoñon et al. (1993) ao realizar a imersão de bulbos de *Narcissus* em água a 54 °C durante uma hora. Este autor observou que o tratamento foi efetivo para a assepsia dos explantes, mas o resultado foi negativo quanto a resposta organogênica, sendo obtida regeneração apenas a partir dos bulbos não tratados. Resultados semelhantes foram observados por Langens-Gerrits et al. (1998) ao utilizar água a 45 °C para assepsia de bainhas foliares de *Lilium*. Estes autores obtiveram a sobrevivência de apenas 12,5% do material não contaminado. Os resultados obtidos no presente trabalho foram considerados positivos, tendo em vista que não houve contaminação de nenhum dos explantes, apesar da alta contaminação dos bulbos e que 50% destes mantiveram a capacidade regenerativa, valor superior aos resultados obtidos por outros autores (VIDOR, 1997; BERGOÑON et al., 1993; LANGENS-GERRITS et al., 1998).

A morte de alguns explantes e a sobrevivência de outros pode ter sido causada pelo efeito diferencial da temperatura da água nas bainhas que compõe o bulbo. Apesar de os explantes não terem sido avaliados com relação a sua posição no bulbo, os explantes inviáveis podem ter sido retirados das bainhas mais externas, ficando mais expostas a ação

da temperatura. Entretanto, segundo Lagens-Gerrits et al. (1998), os efeitos nocivos da termoterapia na taxa de regeneração dos explantes não estão relacionados à temperatura da água, e sim, com a condição de anaerobiose em que são submetidos os tecidos durante o tratamento. Segundo estes autores, com a deficiência por oxigênio ocorre a produção e acúmulo de acetaldeído e etanol ocasionando a rápida deteriorização dos tecidos. No entanto, esta hipótese não explica as diferenças na sobrevivência dos explantes conforme a localização das bainhas no bulbo.

Outra hipótese para as diferenças observadas na sobrevivência dos explantes é a maior capacidade de resposta das bainhas centrais associada ao maior grau de juvenilidade dos tecidos, quando comparadas as bainhas periféricas do bulbo, conforme foi observado na estaquia de bainhas foliares de *Hippeastrum aulicum* (ver capítulo 3). Conforme mencionado anteriormente, no presente trabalho não foi realizada a avaliação dos explantes com relação à sua posição no bulbo. No entanto, a literatura tem relatado o maior potencial morfogênético *in vitro* dos tecidos mais juvenis, neste trabalho representados pelos explantes provenientes da região central do bulbo, descartando neste caso a relação entre a sobrevivência dos explantes e a metodologia utilizada para assepsia dos mesmos.

Apesar de não ter ocorrido a contaminação dos explantes de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, são necessários estudos complementares para aumentar a eficiência da assepsia e a sobrevivência dos explantes. Tendo em vista que a literatura tem relatado o efeito negativo da termoterapia sobre o vigor dos explantes, metodologias alternativas com maiores doses dos desinfestantes e variações do tempo de exposição ou a utilização de antibactericidas e antimicóticos no meio de cultura, poderiam ser estudadas para diminuir o dano aos tecidos e aumentar a sobrevivência dos explantes. Estudos dos efeitos da posição das bainhas no bulbo também poderiam ser conduzidos para avaliar a sobrevivência dos explantes e otimizar o processo de micropropagação.

5.2. Indução e multiplicação de brotações em explantes de bainhas foliares de *Hippeastrum aulicum* micropropagadas

O início do processo morfogênico sobre os explantes de bainhas foliares de *Hippeastrum aulicum* caracterizou-se pela formação de pigmentos de coloração violácea sobre a superfície abaxial das bainhas, aos 45 dias da inoculação em meio de cultura com ANA e BAP, independente das concentrações utilizadas. Após 75 dias em cultura, ocorreu o espessamento dos tecidos localizados na região onde se formaram os pigmentos (Figura 10 – A). Ulrich et al. (1999) associaram o espessamento de bainhas foliares de *Crinum* à presença de auxina no meio de cultura. A auxina é responsável pela reentrada das células no ciclo de divisão celular e pela expansão celular (GEORGE, 1996). No presente trabalho, o espessamento das bainhas foi observado em todos os tratamentos, inclusive naqueles sem auxina. Por isso, foi descartada a hipótese de que o suprimento deste regulador de crescimento ao meio de cultura possa ter induzido o processo, sendo possivelmente ocasionado por outros componentes do meio de cultura.

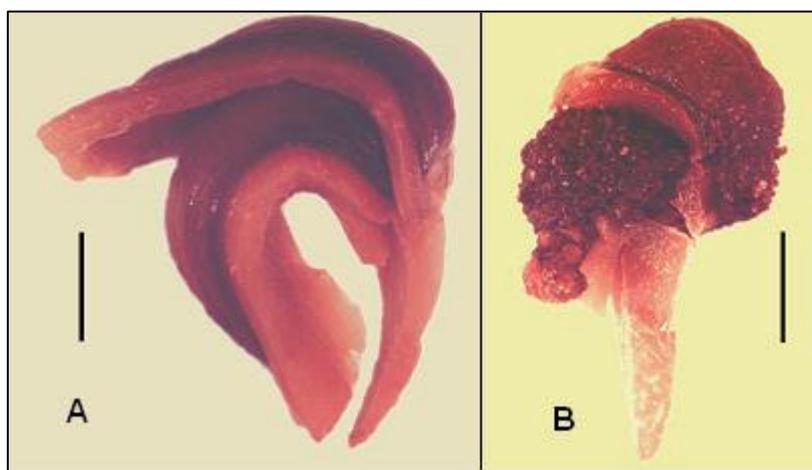


Figura 10 – Explante de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum* inoculado em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) suplementado com 1,0 μM de ANA e 4,0 μM de BAP: A) Espessamento dos tecidos próximos à superfície abaxial das bainhas foliares aos 75 dias da inoculação; B) Produção de calos aos 90 dias da inoculação. Barra = 0,5 cm.

A formação de calos ocorreu sobre a região da bainha, onde inicialmente foi observado o espessamento dos tecidos em todos os tratamentos (Figura 10 – B). No entanto, a maior porcentagem de explantes com calos aos 90 dias, ocorreu com a utilização de 4,0 μM de BAP, ou quando este foi utilizado associado com 1,0 μM de ANA no meio de cultura (Figura 11). Com o balanço de 1,0 μM de ANA e 4,0 μM de BAP suplementado ao meio de cultura, 100% dos explantes apresentaram calos aos 90 dias da inoculação, diminuindo durante os subcultivos a medida que eram formadas as brotações (Figura 11).

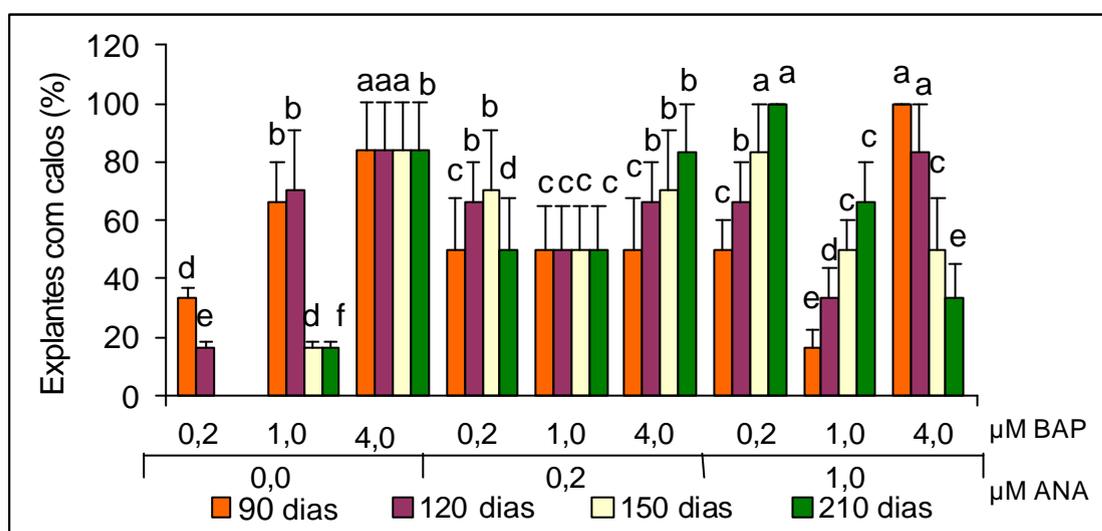


Figura 11 – Porcentagem de explantes de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum* com calos, aos 90, 120, 150 e 210 dias em meio MS com diferentes concentrações da ANA e BAP. Médias com a mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste DMS, quando comparados os tratamentos por período de avaliação.

O efeito de ANA não foi significativo para a proliferação de calos nos primeiros 90 dias. Entretanto, ao longo dos subcultivos, a presença deste regulador juntamente com BAP, foi necessária. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Bach (1992) que demonstrou que altas concentrações de auxina combinadas com citocininas estimulam a formação de calos em explantes de bainhas foliares de *Hyacinthus amethystina*.

Com a utilização dos meios com 1,0 μM de ANA e 0,2 μM de BAP também foi verificada a formação de calos em 100% dos explantes, entretanto isto foi observado

após 210 dias em cultura. Este atraso na resposta dos explantes ao regulador de crescimento pode estar relacionado com a ativação de genes tardios. Em *Arabidopsis*, Vahlkamp (2000) observou que a ativação de diferentes classes de genes foi dependente do estímulo fornecido em resposta à utilização de auxina. As diferenças nas concentrações dos reguladores podem ter ativado diferentes classes de genes, tendo em vista que com 1,0 μM de ANA e 4,0 μM de BAP a produção de calos ocorreu antes que no tratamento com 1,0 μM de ANA e 0,2 μM de BAP.

As brotações formaram-se a partir dos calos e na base das brotações ocorreu a formação de bulbos (Figuras 12 – A e B). Apenas nos explantes do tratamento com 0,2 μM de BAP não foi observada a formação de bulbos. O maior número de brotações (11,50) e de bulbos por explante (11,06), foram obtidos com o balanço de 1,0 μM ANA e 0,2 μM BAP (Figuras 13 e 14). Os meios de cultura suplementados com 1,0 μM e 4,0 μM de BAP, também foram significativos para a produção de brotações e de bulbos. Estes resultados estão de acordo com Mii et al. (1974), Hussey (1975) e Prasad & Chatuverdi (1993), quanto à necessidade de adicionar auxina ao meio de cultura para organogênese em explantes de bainhas foliares de *Hippeastrum* e não confirmam as observações de Tombolato et al. (2001), segundo as quais apenas a presença de BAP influencia na produção de bulbos.

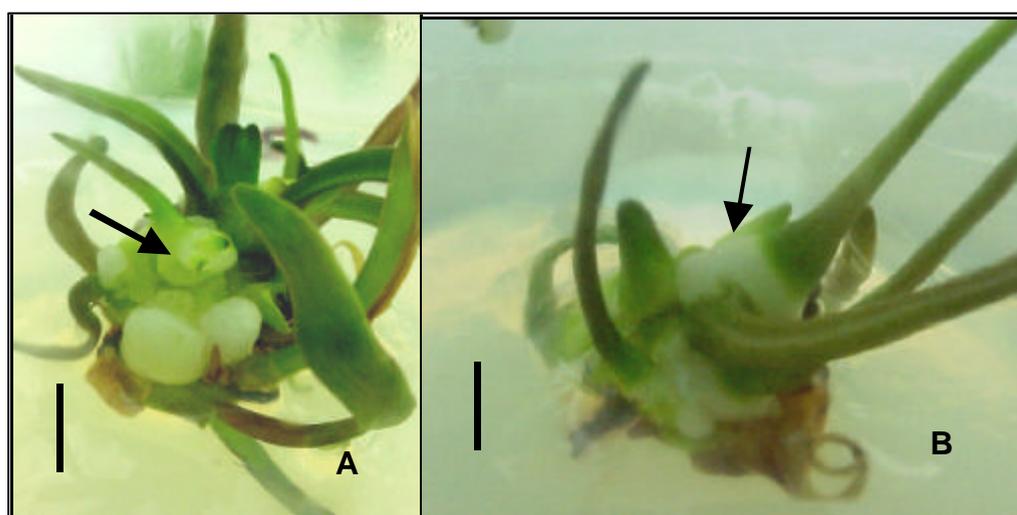


Figura 12 - Morfogênese *in vitro* de explantes de bainhas foliares de *H. aulicum* em meio de cultura Murashige e Skoog (1962), suplementado com 1,0 μM de ANA e 4,0 μM de BAP: A – Detalhe da formação de brotações a partir dos calos; B – Detalhe da formação de bulbos nas bases das brotações. Barra = 1cm.

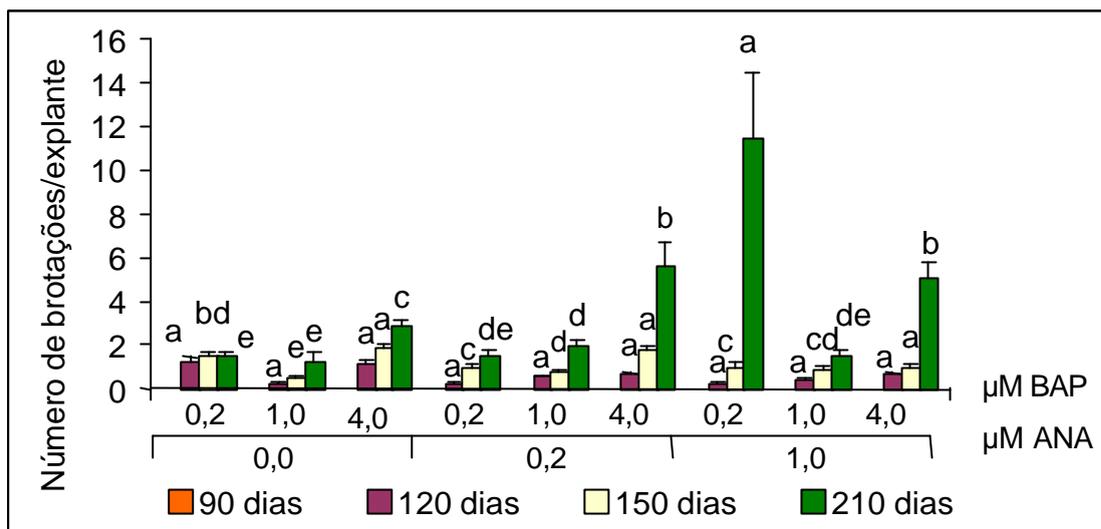


Figura 13 – Número de brotações produzidas por explante de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, aos 90, 120, 150 e 210 dias, em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP. Médias com a mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste DMS, quando comparados os tratamentos por período de avaliação.

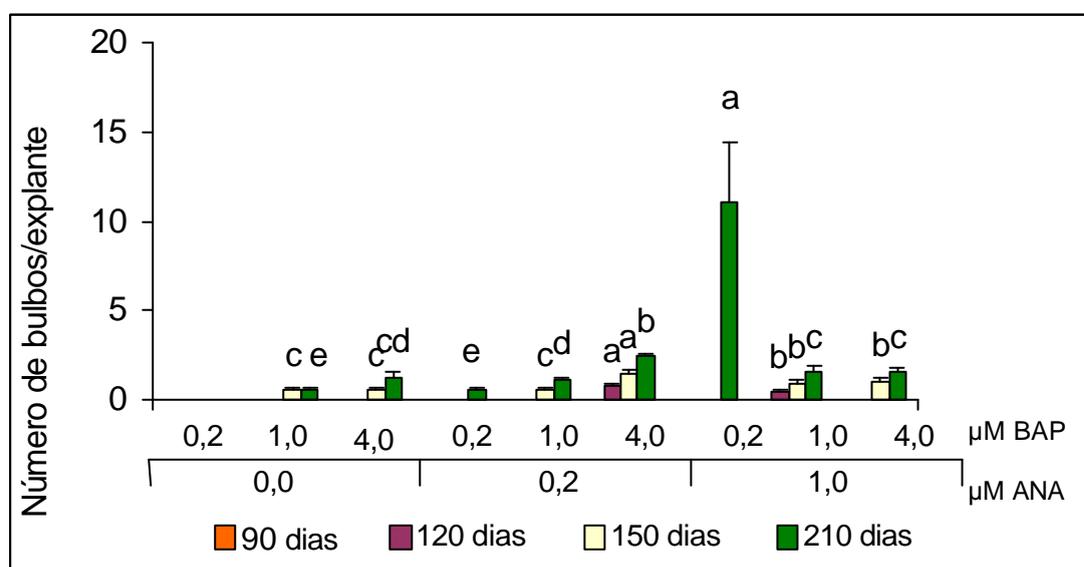


Figura 14 – Número de bulbos produzidos por explante de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, aos 90, 120, 150 e 210 dias, em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP. Médias com a mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste DMS, quando comparados os tratamentos por período de avaliação.

A produção de raízes dependeu do balanço entre auxinas e citocininas utilizado no meio de cultura. A maior produção de raízes ocorreu nos meios de cultura com 0,2 μM de ANA e 4,0 μM de BAP a nos meios de cultura com 1,0 μM de ANA e 0,2 μM de BAP (Figura 15). Skoog & Miller (1957) observaram que a diferenciação de raiz em calos de fumo foi induzida por concentrações relativamente altas de auxina em detrimento às citocininas, enquanto que a relação inversa induziu brotações. Neste trabalho, com os balanços auxinas/citocininas testados não houve inibição de brotações em detrimento à formação de raízes.

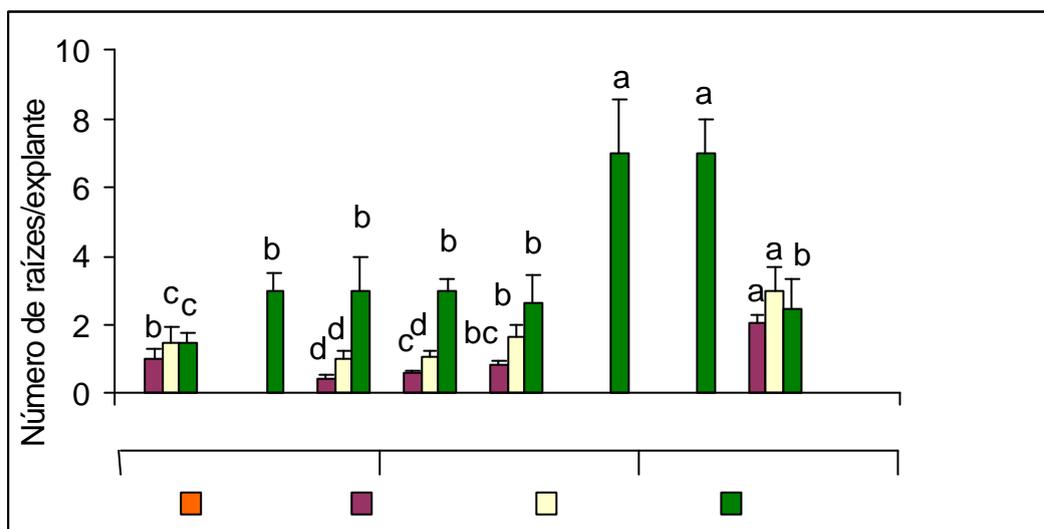


Figura 15 – Número de raízes produzidas por explante de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, aos 90, 120, 150 e 210 dias em meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP. Médias com a mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste DMS, quando comparados os tratamentos por período de avaliação.

Apesar da maior produção de brotações e de bulbos por explante ter sido observada com a utilização dos meios de cultura suplementados com 1,0 μM ANA e 0,2 μM BAP, as concentrações de 1,0 μM de ANA e 4,0 μM de BAP foram consideradas as melhores dentre as testadas. Apesar da alta produção de bulbos com a utilização de 1,0 μM ANA e 0,2 μM BAP, visualmente estes apresentaram tamanho extremamente reduzido (dados não mensurados) (Figura 16).

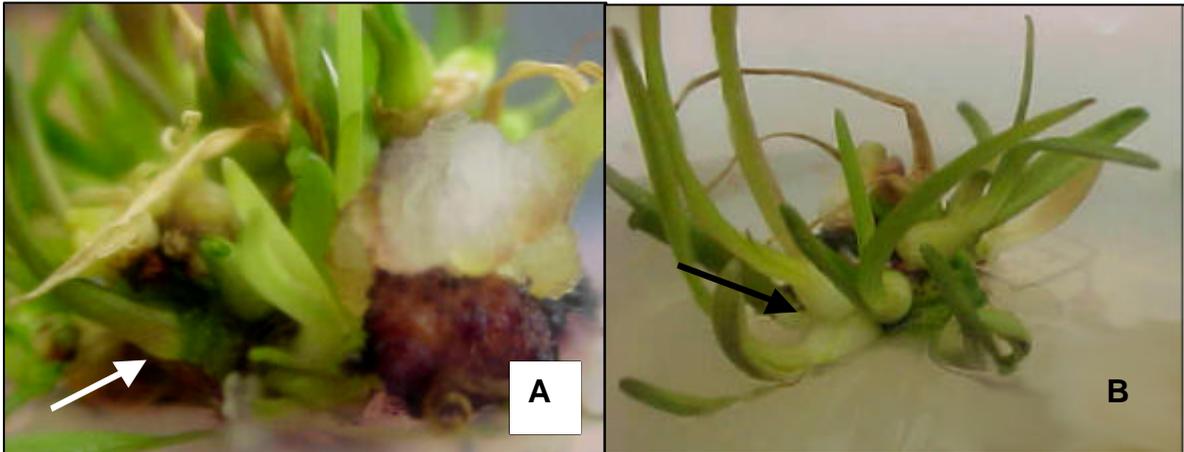


Figura 16 – Detalhe da formação de bulbos em explantes de bainhas foliares de *Hippeastrum aulicum* com a utilização de meio MS, suplementado com 1,0 μ M de ANA e 0,2 μ M de BAP (A) e 1,0 μ M de ANA e 4,0 μ M de BAP (B).

Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Castro & Mathes (1987), na indução de brotações em explantes de bainhas foliares de *Hippeastrum* spp. Estes autores obtiveram o maior número de brotações com a utilização de 1,0 μ M de ANA e entre 0,2 e 4,4 μ M de BAP.

Após 60 dias da transferência para meio MS, suplementado com 1,0 μ M de ANA e 4,0 μ M de BAP, não foi observada a produção de calos. As novas brotações foram formadas na base do bulbo induzido no meio anterior, provavelmente a partir de gemas pré-formadas. Apenas as plantas produzidas no meio de cultura com 1,0 μ M de BAP, e no meio com 0,2 μ M ANA e 4,0 μ M de BAP, apresentaram aumento significativo no número de brotações após a transferência para o meio com 1,0 μ M de ANA e 4,0 μ M de BAP (Figura 17). Também foram observados aumentos na produção de bulbos após a transferência das plantas provenientes dos meios de cultura com 0,2 μ M de ANA e 4,0 μ M de BAP e nas plantas produzidas em meio com 1,0 μ M de ANA e 0,2 μ M de BAP (Figura 17). Estes resultados confirmam a necessidade de suplementar o meio de cultura com auxinas para a indução da organogênese em explantes de bainhas foliares de *Hippeastrum*, conforme discutido anteriormente. Os aumentos nos números de brotações após a transferência para o tratamento com 1,0 μ M de ANA e 4,0 μ M de BAP, salientam a necessidade de maiores concentrações de auxinas e citocininas para formar brotações.

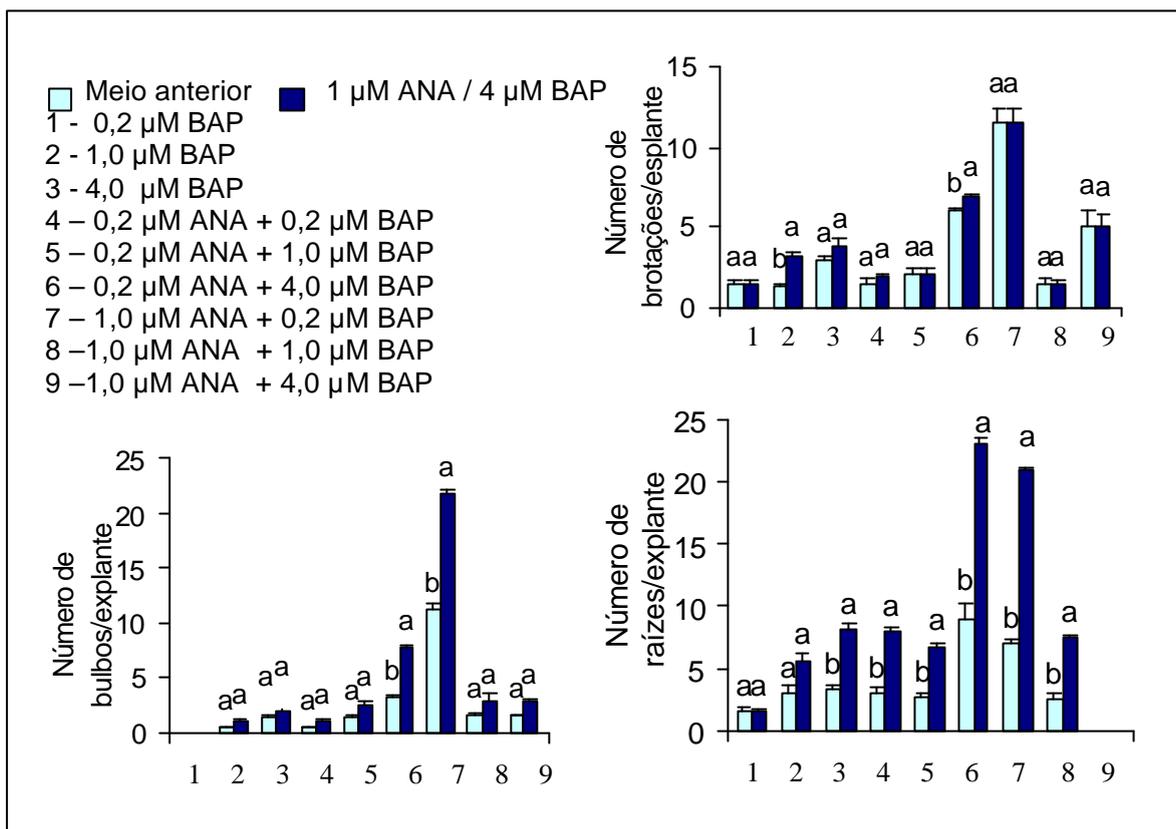


Figura 17 – Número de brotações, bulbos e raízes por explante de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, após 60 dias da transferência de meio MS com diferentes concentrações de ANA e BAP para meio MS com 1,0 μM de ANA e 4,0 μM de BAP. Médias com a mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste-t, quando comparadas antes e após a transferência de meio de cultura.

Não houve aumento no número de raízes produzidas nas plantas provenientes dos meios de cultura com 0,2 μM ou 1,0 μM de BAP após a transferência de meio. Nas plantas provenientes dos demais tratamentos, a produção de raízes aumentou significativamente, inclusive naquelas formadas nos meios com a maior concentração de auxina (Figura 17). Estes dados podem ser interpretados como resultado do efeito residual dos tratamentos anteriores, conforme observado por Moncaleán et al. (2003) em explantes de *Actinidia deliciosa*.

Após 90 dias da transferência dos explantes para os meios de cultura com 1,0 μM de ANA e 10,0 μM; 15,0 μM e 30,0 μM de BAP, observou-se que o número de brotações e de raízes aumentou significativamente durante os subcultivos e que a proliferação de bulbos não diferiu (Tabela 6).

Tabela 6 – Número de brotações, bulbos e raízes por explante de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, após 30, 60 e 90 dias em meio MS suplementado com 1 μM de ANA e diferentes concentrações de BAP.

BAP (μM)	Número de brotações			Número de bulbos			Número de raízes		
	Dias após transferência								
	30	60	90	30	60	90	30	60	90
10	B 2,9a	A 3,56a	A 4,42a	A 1,00a	A 1,30a	A 1,33a	-	B 3,55a	A 4,80a
15	B 3,0a	B 3,57a	A 4,83a	A 1,07a	A 1,33a	A 1,42a	-	A 3,33a	A 4,00b
30	B 2,4a	A 3,73a	A 4,10a	A 1,09a	A 1,30a	A 1,40a	-	A 3,07b	A 3,56c
CV(%)	14,50	16,26	6,21	14,42	20,20	19,64	-	9,58	9,85

Médias precedidas e seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste DMS a 5% de probabilidade de erro, quando comparados os períodos de avaliação e os efeitos dos tratamentos, respectivamente.

A proliferação de bulbos, bem como a de brotações, também não diferiu entre os tratamentos utilizados. Apenas para produção de raízes foram observadas diferenças significativas com o uso de diferentes concentrações de BAP, que foi significativamente maior nos meios com as menores concentrações (Tabela 6). Este resultado demonstra a relação de sinergismo auxinas e citocininas sugerido por Takayama & Misawa (1982), onde uma alta relação citocinina/auxina resulta na formação de brotações e bulbos em detrimento à formação de raízes, conforme também observaram Saniewski (1975) e Brown & Charlwood (1990).

Fatores como a dormência natural dos bulbos, observada após várias subculturas em amarilidáceas (MIELKE et al., 1989; GERRITS et al., 1992, GEORGE, 1996) e a forte dominância apical da gema principal (HUSSEY & HARGREAVES, 1974; BERGOÑON et al., 1992) são frequentemente associados a diminuição na produção de brotações *in vitro*, em espécies de plantas bulbosas. Assim sendo, é possível que estes fatores tenham alguma relação com a ausência na resposta às concentrações de BAP utilizadas, quanto ao número de brotações e de bulbos.

A incisão da gema principal (HUSSEY & HARGREAVES, 1974) ou a inoculação das plantas em meio líquido sob agitação (BERGOÑON et al., 1992) são algumas das técnicas utilizadas para quebra da dominância apical em *Hippeastrum* sp. A utilização de maiores concentrações de BAP no meio de cultura, também

poderia vir a estimular o aumento no número de brotações, durante a fase de multiplicação. Tombolato et al. (2001) obteve os maiores números de bulbos (0,92 a 1,60) em explantes de bainha foliar de *Hippeastrum hybridum* com a utilização de BAP nas concentrações entre 44 μM e 88 μM , com ou sem a suplementação de AIA ao meio de cultura. No entanto, observou-se no presente trabalho que com a utilização de 30,0 μM de BAP houve uma tendência em reduzir o número de brotações e de bulbos por explante, apesar de não significativa (Tabela 6). Isto pode indicar a aproximação de uma concentração limite de BAP para indução de brotações nesta espécie.

Futuros estudos com a utilização de BAP em concentrações entre 15 μM e 30 μM poderiam ser conduzidos para obtenção de um maior número de brotações. No entanto, comparando-se os resultados deste trabalho com os da literatura consultada, conclui-se que estes foram superiores aqueles, demonstrando que a micropropagação através de explantes de bainhas foliares em meio suplementado com ANA e BAP nas concentrações utilizadas, é uma técnica de multiplicação vegetativa viável para obtenção de propágulos de *Hippeastrum aulicum*.

5.3. Análise de compostos fenólicos formados nos explantes de ovário e de bainhas foliares de *Hippeastrum aulicum*, durante a propagação *in vitro*.

A composição dos ácidos fenólicos foi semelhante entre as amostras de tecidos de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum* com pigmentação violácea e as amostras com coloração natural (Tabela 7). Em ambas as amostras foram identificados os ácidos gálico, *cis*-cinâmico e *trans*-cinâmico.

Tabela 7 – Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de ácidos fenólicos em amostras de tecidos de bainha foliar de um bulbo intacto e em amostras de bainha foliar e de ovário de *Hippeastrum aulicum*, após 30 dias da formação de pigmentação violácea *in vitro*, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):

Amostra	Ácido fenólico	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Tecidos de bainha foliar com coloração natural	gálico	1,009
	<i>cis</i> -cinâmico	1,160
	<i>trans</i> -cinâmico	1,131
Tecidos de bainha foliar após a formação de pigmentos	gálico	0,862
	<i>cis</i> -cinâmico	1,013
	<i>trans</i> -cinâmico	0,612
Tecidos de ovário após a formação de pigmentos	gálico	3,833
	<i>cis</i> -cinâmico	5,944
	<i>trans</i> -cinâmico	3,952
	cafeico	0,961
	<i>meta</i> -cumárico	8,420

Com exceção do ácido gálico, os ácidos fenólicos identificados nas amostras de bainhas foliares são fenilpropanóides simples, cuja estrutura se constitui de um anel benzênico ligado a uma cadeia lateral com três carbonos (TAIZ & ZAIGER, 2002). Segundo Lavee et al. (1994), o ácido cinâmico possui ação antioxidante do AIA endógeno e está relacionado com a indução e proliferação de calos de *Olea europaea* juntamente com os ácidos caféico e cumárico. Segundo este autor, o ácido cafeico também possui efeitos semelhantes aos do AIA no metabolismo e pode ser convertido a fenilalanina ou triptofano, que é um precursor de AIA. O ácido

gálico, único dentre os identificados nas amostras que não é biossintetizado a partir da fenilalanina, é um polifenol cuja estrutura se constitui de um anel benzênico com três ligações com grupos hidróxi e a um carbono (TAIZ & ZAIGER, 2002). Este composto participa da biossíntese de taninos, conferindo às plantas mecanismos de defesa contra herbívoros e possui efeito antioxidante do AIA endógeno em culturas de *Saccharum* (LORENZO et al., 2001). O ácido gálico, juntamente com o ácido cinâmico, foram detectados em ambas as amostras de bainha foliar de *H. aulicum* analisadas.

Os ácidos fenólicos identificados nos tecidos de bainha foliar foram detectados em maiores quantidades nos tecidos com coloração natural (Tabela 7, Figura 18 e 19). Com a excisão do explante durante a introdução *in vitro* e exposição à luz, na sala de crescimento, os níveis dos compostos fenólicos nos tecidos tendem a aumentar, pois de acordo com Taiz & Zeiger (2002), a atividade da enzima fenilalanina amônia liase, que cataliza a reação de biossíntese de compostos fenólicos a partir da fenilalanina, é influenciada por fatores ambientais como luz, injúria mecânica aos tecidos, entre outros. A maior concentração dos ácidos fenólicos nos tecidos com coloração natural, observada no presente trabalho, pode indicar que estes compostos foram utilizados durante o processo de diferenciação *in vitro*, evidenciando a participação dos mesmos no processo morfogênético.

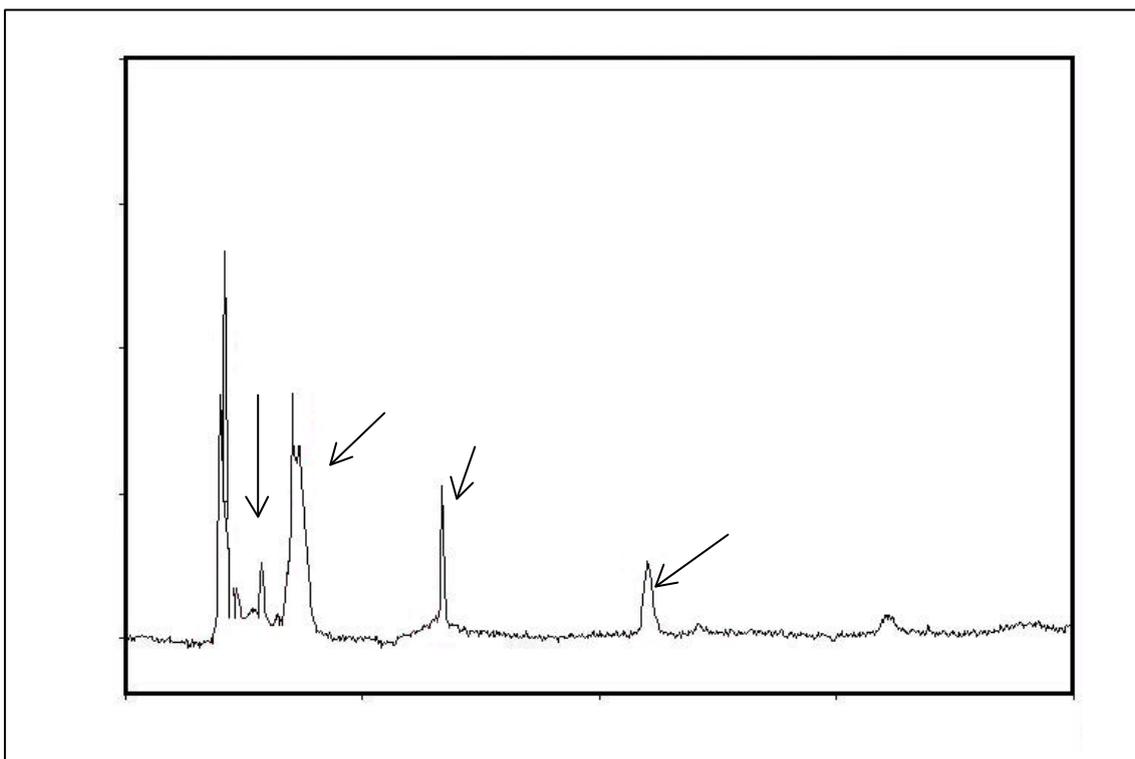


Figura 18 – Cromatograma de extratos de tecidos de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum* com coloração natural, registrados à 280 nm.

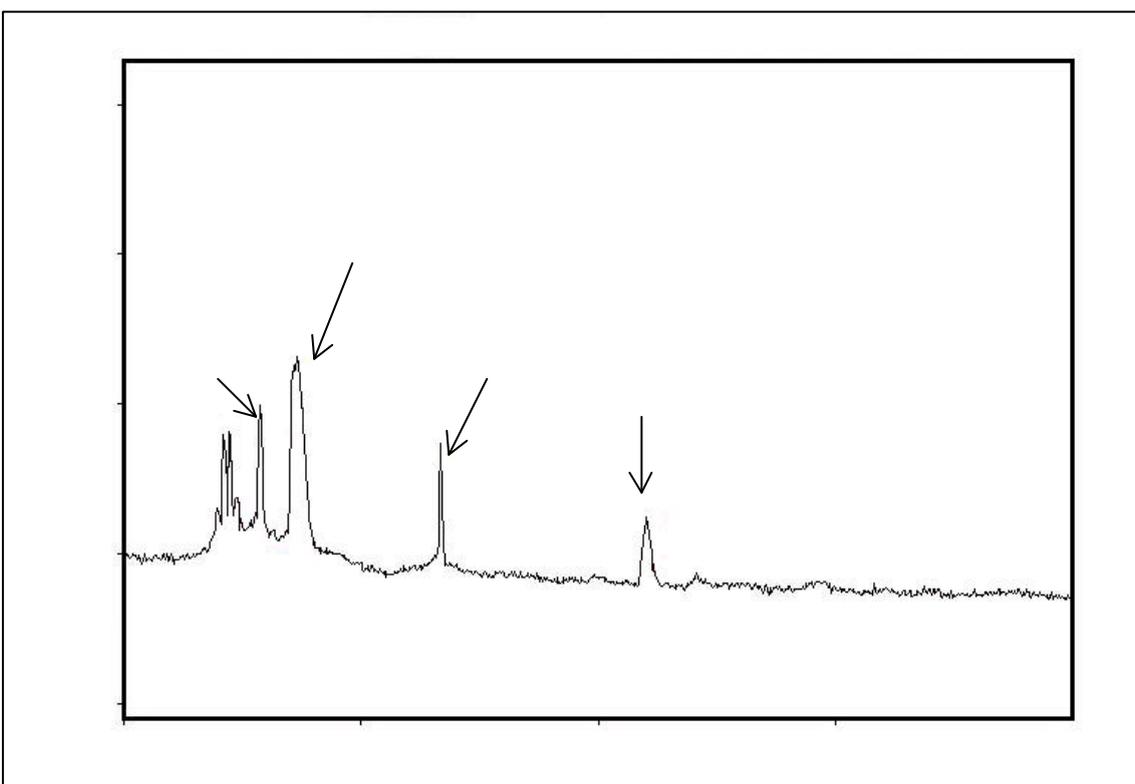


Figura 19 – Cromatograma de extratos de tecidos de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum* cultivados em meio MS suplementado com 1 μ M de ANA e 4 μ M de BAP, após 30 dias da detecção visual de pigmentação violácea, registrados à 280 nm.

De acordo com Ryan et al. (2002) e Angelova et al. (2001), os compostos fenólicos são encontrados em todas as partes da planta, mas sua natureza e concentração variam grandemente entre os vários tecidos. Entretanto, neste trabalho os resultados das análises foram semelhantes qualitativamente entre as amostras de tecidos de bainhas foliares e de tecidos de ovário (Tabela 7). A afirmativa dos autores foi verdadeira apenas com relação às diferenças na concentração dos compostos nos tecidos, sendo superiores nos tecidos de ovário (Tabela 7 e Figuras 18, 19 e 20).

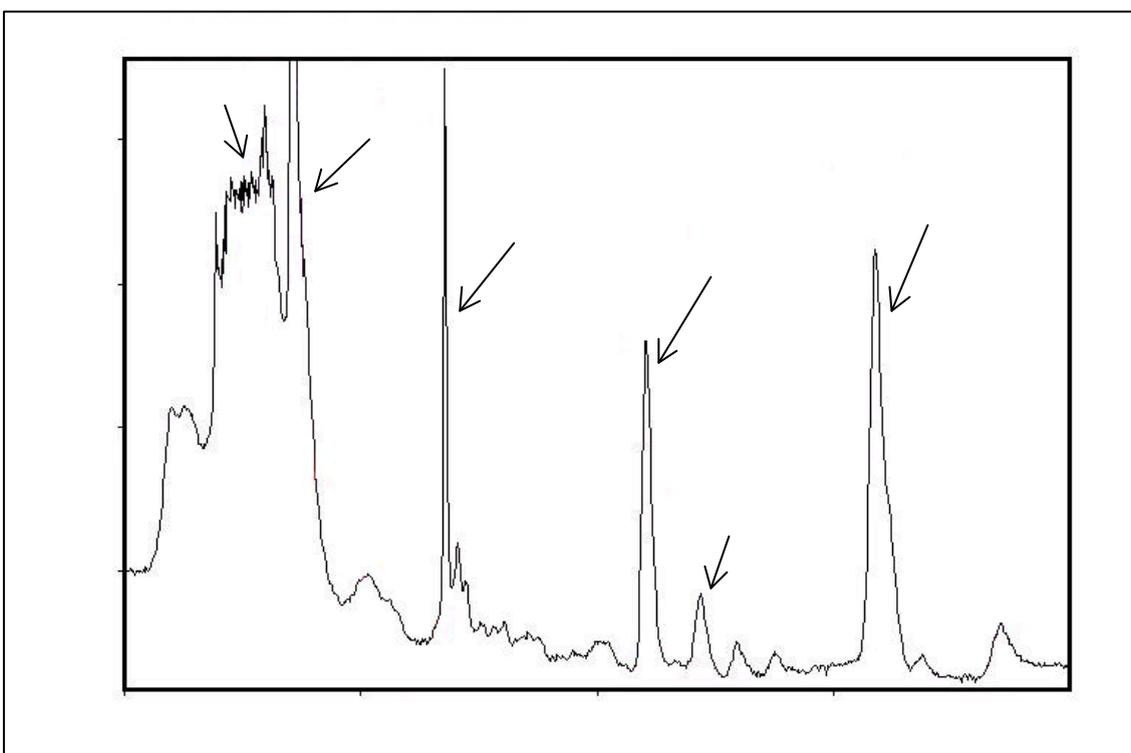


Figura 20 – Cromatograma de extratos de tecidos oxidados de ovário de *Hippeastrum aulicum* cultivados em meio MS, após 30 dias da detecção visual de pigmentação violácea nos tecidos, registrados à 280 nm.

Um dos fatores determinantes da concentração dos fenóis nos tecidos é o seu grau de lignificação, pois participam da síntese de lignina (TAIZ & ZEIGER, 1994; ZIOUTI et al., 1994). Neste trabalho, as maiores concentrações de fenóis observadas nos tecidos de partes florais podem ser explicadas pelo fato de que estes tecidos possuem um grau de lignificação maior que os tecidos provenientes de camadas de bainhas foliares. Além disso, órgãos de plantas expostos à luz, como inflorescências, normalmente produzem uma maior quantidade de fenóis como um

mecanismo de proteção dos tecidos contra radiação UV (TAIZ & ZEIGER, 2002). Os bulbos por serem órgãos subterrâneos, não são expostos à luz, possuindo naturalmente menor concentração destes compostos que as inflorescências. Além do maior grau de lignificação e maior exposição à radiação das inflorescências, outros fatores podem estar relacionados com as altas concentrações de compostos nestes órgãos, como a idade fisiológica do tecido (GEORGE, 1996), o desenvolvimento de mecanismos para atrair polinizadores e outros.

Como foi discutido anteriormente, a presença destes compostos em culturas *in vitro* tem sido associada à indução do processo morfogênico. Neste trabalho, foi verificado que para os explantes de bainhas foliares, esta afirmativa foi verdadeira. Entretanto, nos explantes constituídos de ovário e nos demais explantes de partes florais, a formação de compostos fenólicos foi acompanhada da morte dos tecidos. Segundo Lavee et al. (1994), um ácido fenólico pode inibir ou estimular o desenvolvimento dependendo do tecido, pois este ácido pode não agir independentemente sobre a morfogênese, mas em sinergismo com outras substâncias que variam entre os tecidos da planta. O efeito diferencial dos fenóis nos tecidos poderia explicar as respostas observadas pelos explantes neste trabalho, assim como, as altas concentrações destes ácidos nos tecidos de ovário, apesar de não ter sido encontrados trabalhos atribuindo efeito fitotóxico a estes fenóis em culturas de tecidos.

Com base nos resultados, para a micropropagação da espécie *Hippeastrum aulicum* a partir de explantes de partes florais é necessário o desenvolvimento de metodologias para o controle da produção de compostos fenólicos *in vitro*, evitando assim a morte dos explantes. Os resultados obtidos com explantes de bainhas foliares abrem perspectivas para novos estudos avaliando-se os efeitos de ácidos fenólicos suplementados ao meio para indução de morfogênese na micropropagação da espécie.

5.4. Análises histológicas

Para o estudo do processo de morfogênese sobre os explantes de bainha foliar de *H. aulicum in vitro*, foram estabelecidos diferentes estágios em função do tempo de cultura, nos quais observaram-se alterações anatômicas que culminaram na formação de calos. Não foram mencionadas neste trabalho as concentrações de ANA e BAP utilizadas, tendo em vista que as mudanças foram histologicamente semelhantes entre os explantes, independente das concentrações dos reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura.

As bainhas foliares são constituídas por epiderme uniestratificada, a qual delimita o mesofilo formado por tecido parenquimático (Figura 21). Nas células do parênquima observa-se grande quantidade de grãos de amido (Figuras 21 e 22). O mesofilo é interrompido por feixes vasculares colaterais (Figura 21) e canais secretores (Figura 23), com evidente cavidade delimitada por células secretoras.

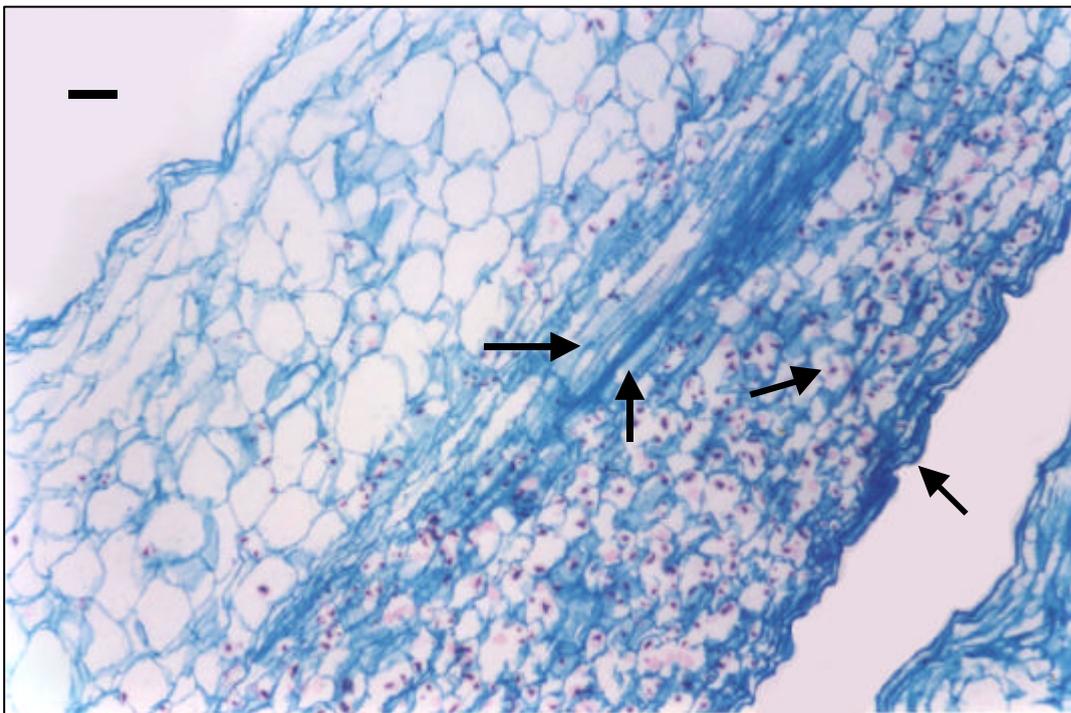


Figura 21 – Secção transverso-longitudinal de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, aos 10 dias da inoculação em meio MS, suplementado com ANA e BAP. Legenda: a=grãos de amido; ab=superfície abaxial; ep=epiderme; f=floema; p=parênquima; x=xilema.

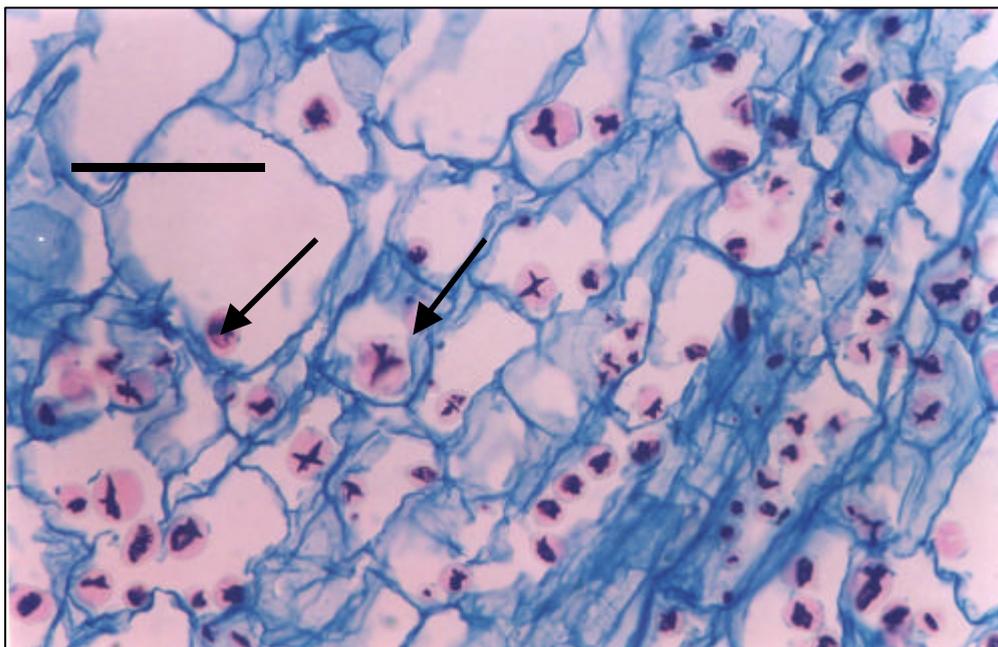


Figura 22 – Detalhe dos grãos de amido no interior das células do parênquima do mesofilo da bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, antes da inoculação em meio de cultura.

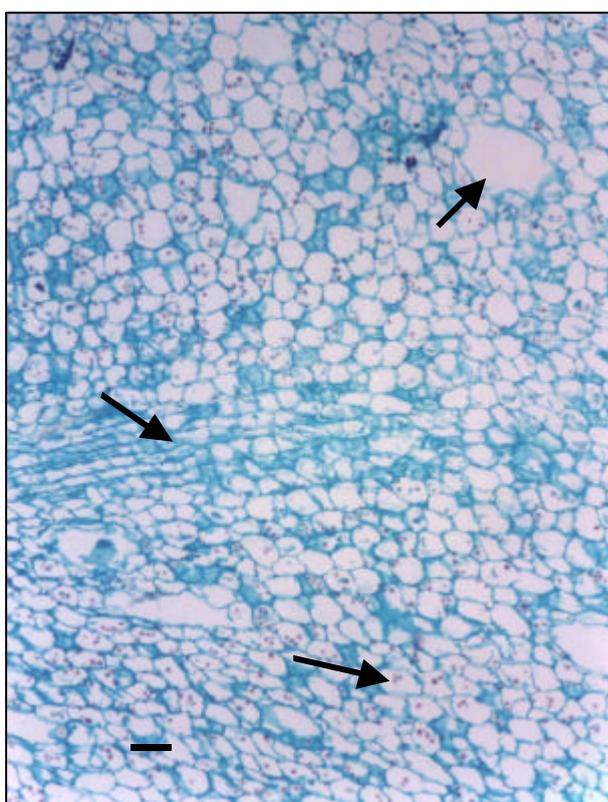


Figura 23 – Detalhe do mesofilo de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, antes da inoculação em meio de cultura. Legenda: a=grãos de amido; cs = canal secretor; fx=feixe vascular; p=parênquima.

A primeira mudança observada nos tecidos foi o aumento da concentração do amido nas células parenquimáticas próximas à epiderme na superfície abaxial da bainha, aos 10 dias da inoculação *in vitro* (Figura 21). Anteriormente os grãos de amido estavam distribuídos uniformemente no mesofilo (Figura 23). Esta deposição de amido foi observada em células do parênquima do mesófilo de *Lilium longiflorum* antes do início da divisão celular (ROH, 1982) e, também é comumente observada antes de ocorrer morfogênese em culturas de suspensões celulares e de células de calos (MURASHIGE & NAKANO, 1968; THORPE & MURASHIGE, 1968). Presume-se que o amido age como uma reserva celular direta de energia necessária para morfogênese, tendo em vista que este processo demanda alta energia. O acúmulo de amido também pode influenciar a morfogênese alterando o potencial osmótico das células para que ocorra a expansão e divisão celular e mudanças no metabolismo como o aumento na concentração de substâncias no interior da célula (GEORGE, 1996). Através de observações das secções de bainhas foliares de *H. aulicum* das fases subseqüentes, constatou-se que o acúmulo de amido ocorreu nas regiões onde foi iniciada a formação do calo.

Aos 15 dias da inoculação de cultura, observaram-se macroscopicamente, regiões de coloração violácea sobre os explantes. A análise destes tecidos, em CLAE, revelou a presença de compostos fenólicos (ver item 5.3). A manifestação de coloração vermelha, em tecidos de bainhas foliares de *Hippeastrum*, injuriados mecanicamente, foi relacionada, por diversos autores, com a presença de compostos fenólicos (TAIPO, 1966; SANIEWSKA & SANIELSKI, 1992; SANIEWSKA, 1992; SANIEWSKI et al., 1992). Assim, é possível que compostos fenólicos sejam os responsáveis pela coloração violácea observada no explante de *H. aulicum*.

A alteração na coloração foi acompanhada pela degradação das células epidérmicas e pela formação de um tecido meristemático periférico (Figuras 24-A e 24-B). A partir da observação das secções, sugere-se que o tecido meristemático periférico foi formado em resposta aos danos à epiderme. A proliferação destas células meristemáticas localizadas imediatamente abaixo da epiderme, forma um parênquima meristemático (Figuras 24-B e 24-C), possivelmente em resposta aos componentes do meio de cultura. Também foi observada a origem do processo morfogênético a partir de células próximas à epiderme de bainhas foliares em vários trabalhos (KRAUSE, 1980; AARTRIJK & BLOM-BARNHOORN, 1983;

NIEDERWIESER & VCELAR, 1990; KROMER & KUKUTCZANKA, 1992; VIDOR, 1995). Segundo Kromer (1988), a regeneração a partir da divisão de células próximas à periferia é comum em explantes provenientes de estruturas de reserva. A presença de grande quantidade de grãos de amido na bainha foliar, referida anteriormente, denota a função de acúmulo de reservas deste órgão em *H. aulicum*.

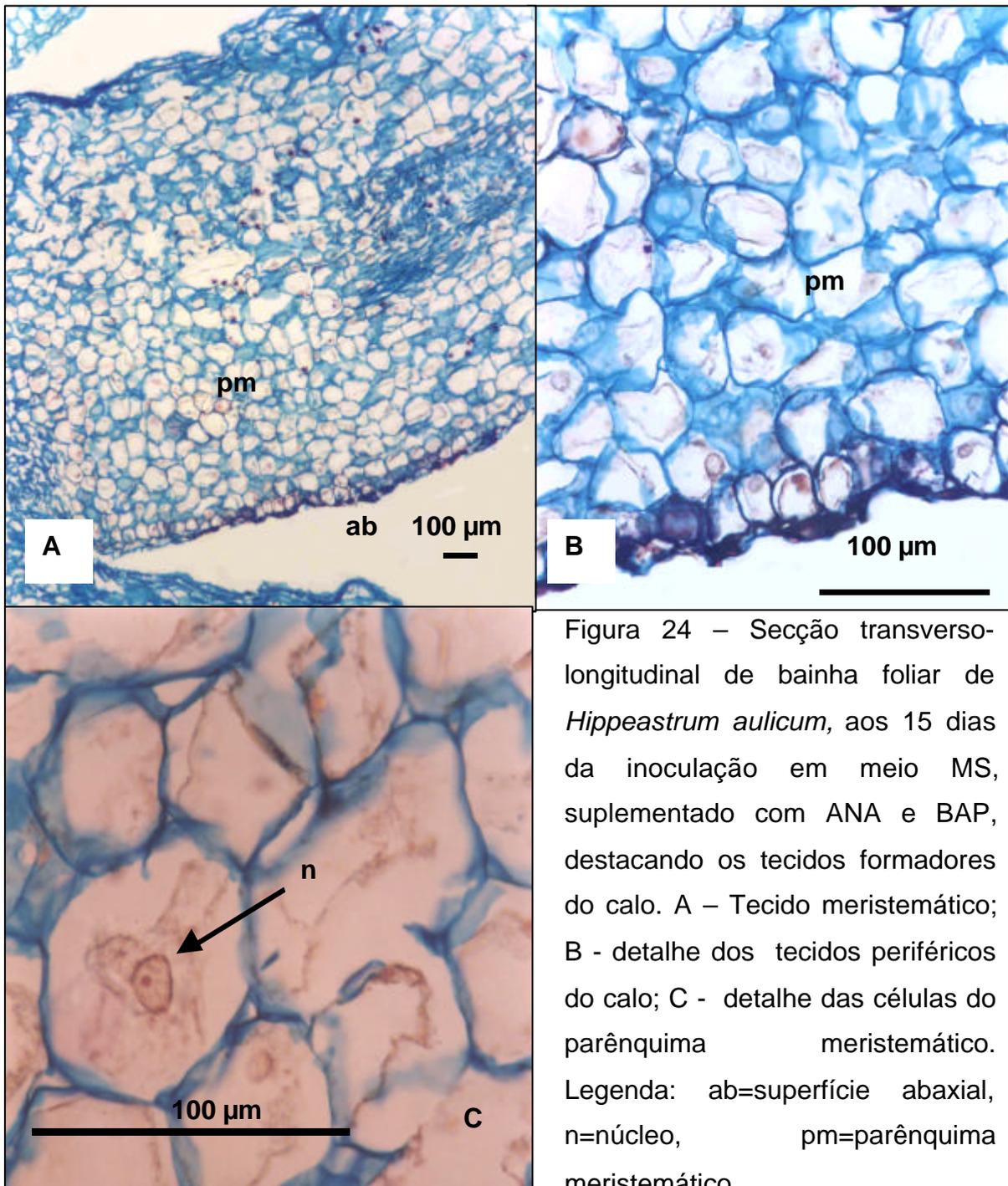


Figura 24 – Secção transverso-longitudinal de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, aos 15 dias da inoculação em meio MS, suplementado com ANA e BAP, destacando os tecidos formadores do calo. A – Tecido meristemático; B - detalhe dos tecidos periféricos do calo; C - detalhe das células do parênquima meristemático. Legenda: ab=superfície abaxial, n=núcleo, pm=parênquima meristemático.

A proliferação de células ocorre também a partir de um tecido meristemático interno, localizado na região entre o tecido parenquimático e o parênquima meristemático. Este tecido passa a ser bem mais evidente em fases posteriores (Figura 25-A). A atividade de ambas as regiões de proliferação celular contribui para formação do calo.

As células do calo apresentaram forma irregular, com núcleo proeminente, parede celular delgada (Figura 24-C) e de tamanho maior que as células parenquimáticas (Figura 24-A). A presença de tecidos com coloração violácea, provavelmente determinada pelos compostos fenólicos, observada sobre os explantes aos 15 dias da inoculação, foi observada também nas células do calo formado. Entretanto, nas secções não foi possível visualizar a localização dos compostos fenólicos, provavelmente devido à não preservação dos mesmos durante a preparação das secções.

Aos 60 dias da inoculação, as células do calo dividiam-se ativamente, principalmente a partir dos tecidos meristemáticos periférico (Figuras 25 A e B) e interno (Figura 25-A). As células destes tecidos apresentaram-se na forma retangular e achatada radialmente, estando dispostas em uma ou duas camadas tangenciais contínuas, como pode ser evidenciado no detalhe do meristema periférico na Figura 25-B. Células de ambas as regiões meristemáticas indicam evidências de características anatômicas e funcionais que podem ser definidas como típicas de felogênio. Segundo Esaú (1976), o felogênio pode surgir nas camadas epidérmicas e sub-epidérmicas, ou mais profundamente no parênquima, dando origem à periderme, para substituir a epiderme em caso de lesões mecânicas ou em caule e raízes de plantas que apresentam crescimento secundário contínuo. De acordo com este autor, a divisão do felogênio também pode ocorrer na presença de amido e compostos fenólicos. Isto foi verificado neste trabalho, pois como descrito anteriormente, nas fases iniciais da morfogênese nas bainhas foliares de *H. aulicum* ocorreu o acúmulo de amido e formação de compostos fenólicos acompanhado da degradação da epiderme. Os componentes do meio de cultura podem ter induzido uma maior proliferação das células do felogênio, formando amplo tecido meristemático interno, o parênquima meristemático, resultando na formação do calo.

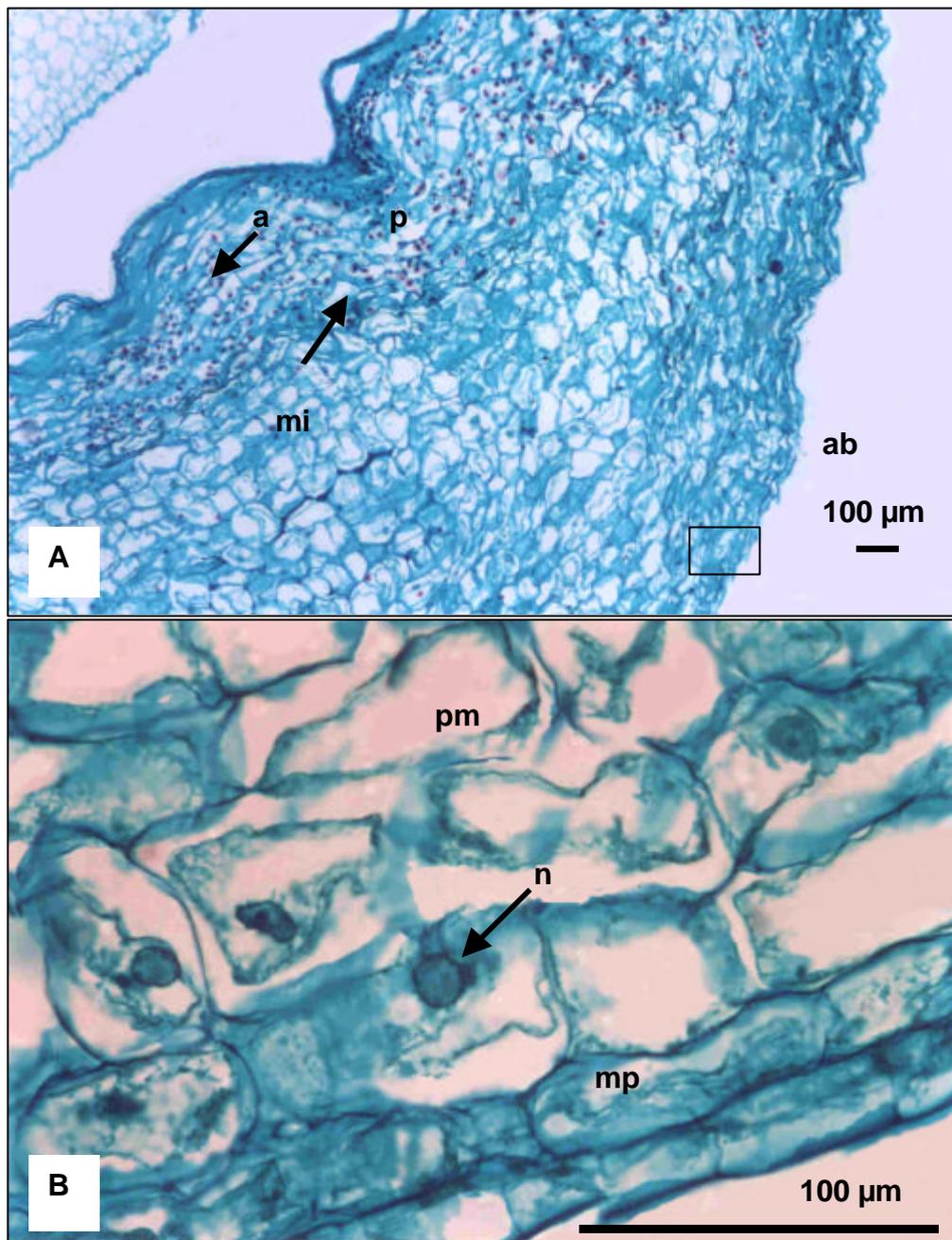


Figura 25 – Secção transverso-longitudinal de bainha foliar de *H. aulicum*, aos 60 dias da inoculação, em meio MS suplementado com ANA e BAP. A – Vista geral da bainha, com presença de calo desenvolvido e constituído por tecidos meristemáticos. B – Detalhe da região periférica do calo. Legenda: a = grãos de amido; ab = superfície abaxial; mi= meristema interno; mp= meristema periférico; n = núcleo; p = parênquima; pm= parênquima meristemático.

Além dos componentes do meio, o efeito da exposição dos explantes à luz também pode ter desencadeado o início da morfogênese. Segundo Zeeuw (1941) a exposição dos tecidos à luz acelera o desenvolvimento da periderme. Nas culturas de bainhas foliares de *H. aulicum*, a formação de calos ocorreu somente após a transferência das culturas para ambiente com luz, evidenciando a influência deste fator sobre o processo da morfogênese. O mesmo efeito da luz como promotor sobre o início da morfogênese *in vitro*, foi verificado por Castro & Mathes (1987) em explantes de bainhas foliares de *Hippeastrum* spp.

Aos 90 dias da inoculação dos explantes *in vitro*, a intensa atividade meristemática, na face abaxial da bainha foliar, determinou um aumento expressivo no volume do calo e a formação de calos secundários sobre o calo inicial (Figura 26).

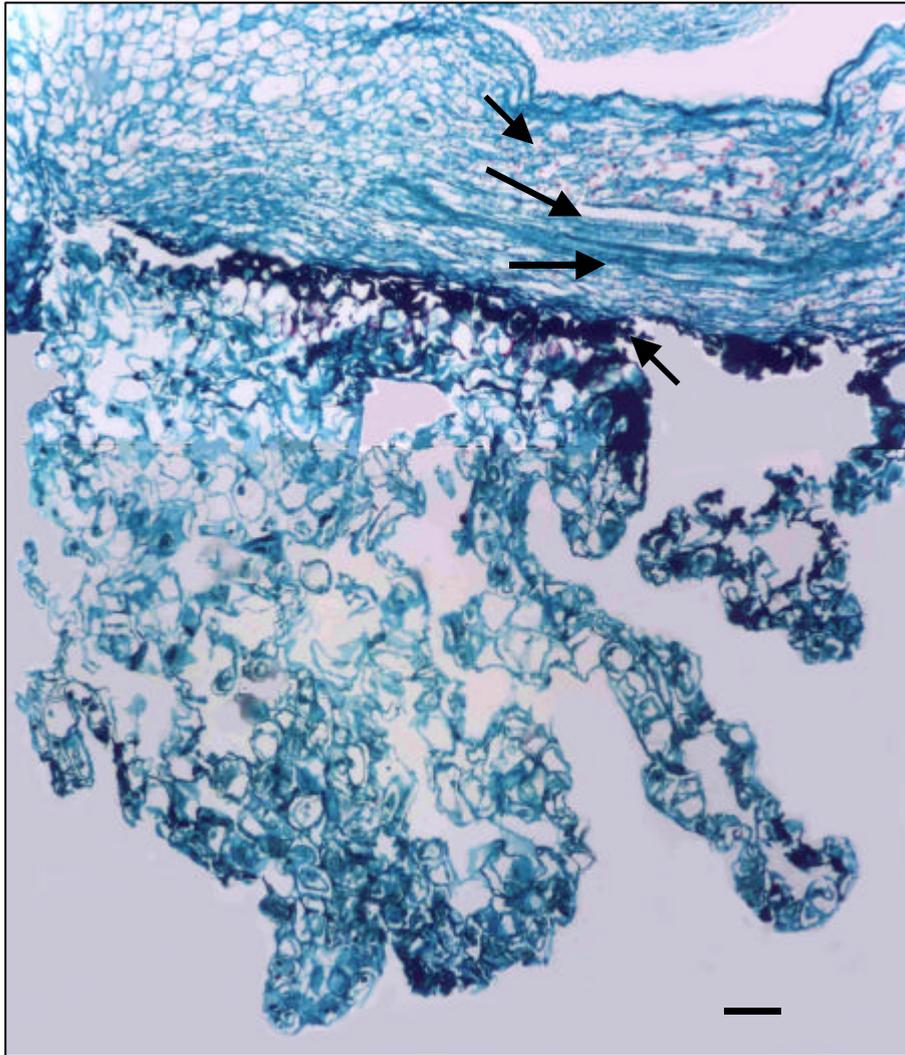


Figura 26 – Secção transverso-longitudinal de bainha foliar de *Hippeastrum aulicum*, aos 90 dias da inoculação em meio MS, suplementado com ANA e BAP, evidenciando os calos, inicial e secundários, formados na superfície abaxial. Legenda: a = grãos de amido; ab = superfície abaxial; cf = compostos fenólicos; ci = calo inicial; cs = calos secundários; f = floema; p = parênquima; x = xilema.

O acompanhamento do processo de morfogênese, através de secções, possibilitou constatar que o início das primeiras alterações anatômicas, que culminaram com a formação do calo, ocorreram na superfície abaxial da bainha, sugerindo que as células sensíveis ao estímulo dos reguladores de crescimento localizavam-se nesta região. Este resultado está de acordo com as observações feitas por Paek & Thorpe (1990) e George (1996). Segundo estes autores, as células da superfície abaxial de bainhas foliares de amarilidáceas possuem alta capacidade regenerativa. Esta polarização no processo de diferenciação *in vitro* também foi observada em explantes de bainhas foliares de *Hyacinthus* sp (YANAGAWA & SAKANISHI, 1980; VIDOR, 1995), *Lachenalia* sp (NIEDERWIESER & VCELAR, 1990) e *Muscari botrioides* (KROMER & KUKUTCZANKA, 1992). Nestas espécies, os autores observaram a atividade meristemática em ambas as superfícies da bainha, porém a proliferação de gemas ocorreu mais intensamente em uma das superfícies. No presente trabalho, foi observada atividade meristemática apenas na superfície adaxial da bainha.

Nesta fase do desenvolvimento, foi possível visualizar uma coloração intensa nas secções do calo, provavelmente correspondendo aos compostos fenólicos. Os compostos fenólicos foram observados em todo o calo, porém mais intensamente na região entre o calo inicial e os secundários e nas regiões periféricas dos calos secundários, provavelmente por serem regiões de maior concentração (Figura 26, Figura 27 A e B).

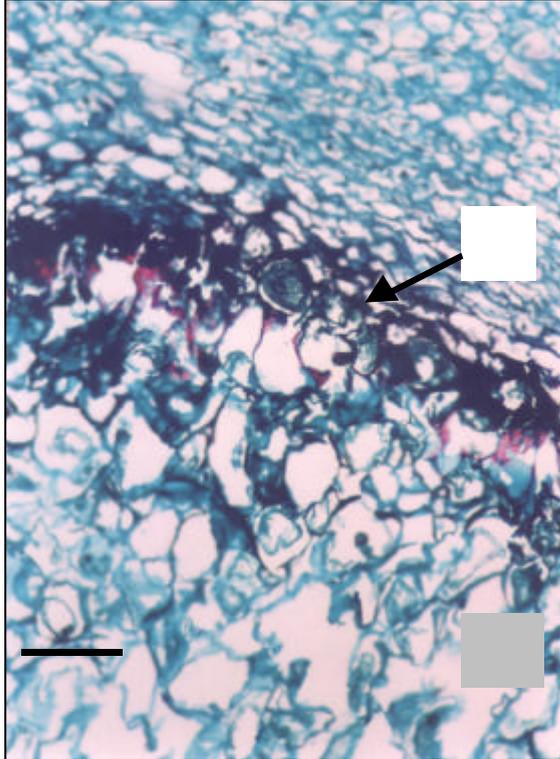
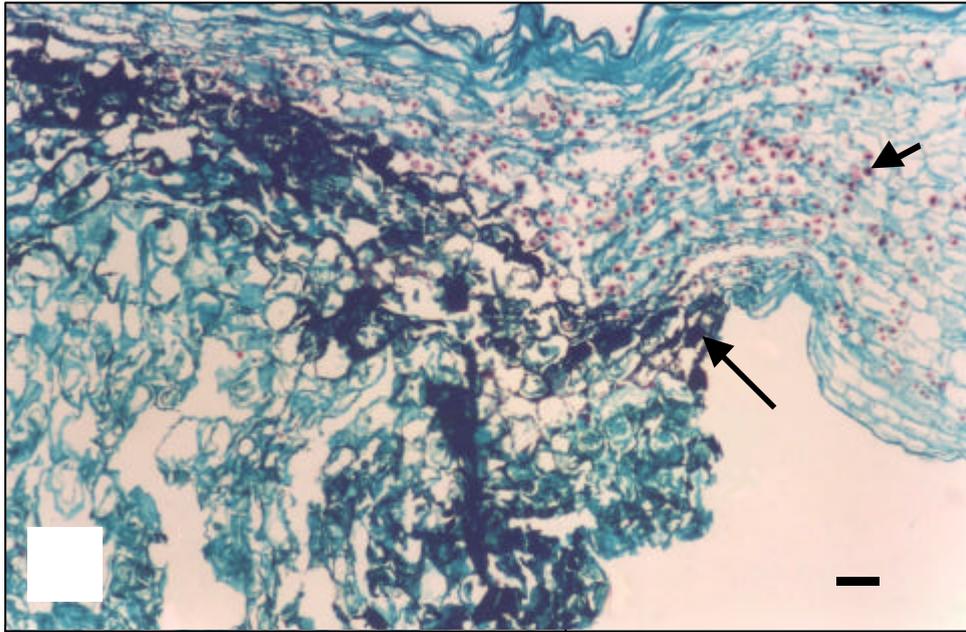


Figura 27 – Secção transverso-longitudinal de bainha foliar de *H. aulicum*, aos 90 dias da inoculação em meio MS, suplementado com ANA e BAP. A – Aspecto geral do calo na face abaxial da bainha; B – detalhe da região de transição entre o calo inicial e os secundários, evidenciando o acúmulo de prováveis compostos fenólicos. Legenda: a=grãos de amido; ab=superfície abaxial; cf=compostos fenólicos; ci=calo inicial; cs=calos secundários; p=parênquima.

Os compostos fenólicos podem ter sido produzidos pelos tecidos do explante e acumulados nas regiões periféricas ao calo na tentativa de isolamento do mesmo. O mesmo pode ter ocorrido entre o calo inicial e os secundários. A morte das células adjacentes ao ferimento, causada pela ação dos compostos fenólicos é um mecanismo de defesa das plantas para impedir o avanço da injúria (FOSKET, 1994). Entretanto, a produção destes compostos foi observada também nas fases iniciais. Alguns trabalhos têm relacionado a produção de compostos fenólicos com o aumento da atividade meristemática das células (LAVEE et al., 1994; GEORGE, 1996; LORENZO et al., 2001). Segundo Leavee et al. (1994), os compostos fenólicos agem sobre o controle da biosíntese e metabolismo da auxina e também agem como promotores ou inibidores de enzimas envolvidas na sua oxidação. Acredita-se que estes compostos tenham exercido influência sobre as respostas *in vitro* nos explantes de *H. aulicum*, como discutido no item 5.3 deste capítulo.

É importante ressaltar, que no presente trabalho, a função do segmento do caule não foi manter as camadas unidas e proteger o meristema existente entre elas, conforme relatado por George (1996). Tendo em vista que a formação dos calos ocorreu a partir de células subepidérmicas das bainhas foliares e não a partir do meristema pré-existente entre as bainhas, o segmento do caule pode ter influenciado no processo de morfogênese através do fornecimento de substâncias reguladoras de crescimento, conforme descrito por Yang et al. (1989) e Huang et al. (1990) em *H. hybridum*. Evidências de conexões vasculares entre o segmento do caule com as regiões de tecidos onde ocorreu a desdiferenciação em *H. aulicum* reforçam esta hipótese. Vidor (1995) observou que é possível induzir a formação de gemas em explantes de bainha foliar sem a presença do caule, entretanto quando este estava presente o número de gemas produzidas foi superior.

Neste trabalho foram verificados vários aspectos inerentes à morfogênese *in vitro* de explantes de bainhas foliares de *H. aulicum*. Porém, alguns aspectos necessitam ser melhor elucidados, entre estes os fatores relacionados à polarização do início das atividades meristemáticas nas células próximas à superfície abaxial da bainha.

De acordo com a literatura, os fatores envolvidos na polarização das respostas morfogênicas variam entre as espécies. Em *Lanchnaria* sp. este fenômeno é associado a maior capacidade regenerativa das células (NIEDERWIESER & NDOU, 2002). Em *Hyacinthus* sp., quando as células das

regiões mais regenerativas da bainha são inoculadas isoladamente não ocorre a diferenciação, evidenciando a participação da localização de auxinas e citocininas endógenas sobre o processo (TAMURA, 1978). Observações de Van Aartrijk et al. (1986) confirmam esta hipótese, tendo em vista que estes autores modificaram os sítios de regeneração em bainhas foliares de *Hyacinthus* com o uso de reguladores de crescimento. No presente trabalho, observou-se que em *H. aulicum* a diferenciação ocorreu na superfície abaxial da bainha, independente das concentrações dos reguladores de crescimento utilizados. Isto indica que as concentrações utilizadas não foram suficientes para modificar o sítio de regeneração nas bainhas. Entretanto, a utilização de diferentes auxinas ou citocininas ao meio de cultura, em maiores concentrações que as testadas, poderiam ser utilizadas em estudos subseqüentes para verificar a participação dos reguladores de crescimento sobre a polarização das respostas *in vitro*.

A maior atividade meristemática das células epidérmicas e subepidérmicas da região abaxial da bainha em amarilidáceas, se deve à maior proximidade com os feixes vasculares (Yanagawa & Sakanishi, 1980). Segundo esses autores, a formação de brotações próxima aos feixes da bainha poderia indicar uma conexão vascular entre ambos. Entretanto, em *Hippeastrum hybridum*, Huang et al. (1990) observaram a formação de conexões vasculares entre as brotações da bainha interna e feixes da bainha externa, não sendo verificada a formação de órgãos nesta bainha. Em *H. aulicum* pode ser observada esta proximidade (Figuras 21 e 26), podendo ainda ser considerado que é exatamente o floema que mais se aproxima da região onde se forma o calo. No entanto, este estudo não se estendeu até a formação das brotações e por isso não foi estudada a formação de conexões vasculares entre bainha e órgãos formados. Porém, acredita-se que tenha ocorrido a formação das conexões entre brotações com os feixes das bainhas onde foram formados, conforme foi observado por Yanagawa & Sakanishi (1980), tendo em vista que a morfogênese ocorreu em ambas as bainhas foliares de *H. aulicum*, ao contrário do observado por Huang et al. (1990).

Assim sendo, a realização de estudos complementares, com o uso de diferentes reguladores de crescimento, em diferentes concentrações, juntamente com a utilização de diferentes regiões do tecido da bainha, poderiam elucidar os fatores envolvidos no processo morfogênético.

6. CONCLUSÕES

- A micropropagação mostrou-se uma técnica viável para a multiplicação vegetativa de *Hippeastrum aulicum*;
- Duplas camadas de bainhas foliares inseridas em uma porção do caule são mais indicadas como fonte de explante que segmentos de partes florais;
- A utilização de termoterapia não é indicada como metodologia para assepsia dos explantes de bainhas foliares, tendo em vista que esta pode ter causado a redução da sobrevivência dos explantes;
- A presença de auxina e a utilização de maiores níveis de citocininas suplementados ao meio de cultura são necessárias para indução da morfogênese *in vitro*;
- A produção de compostos fenólicos durante a micropropagação de bainhas foliares sugere o envolvimento dos mesmos no início do processo morfogenético;
- A origem da diferenciação das brotações *in vitro* ocorre a partir de células subepidérmicas da superfície abaxial das bainhas foliares independente das concentrações dos reguladores de crescimento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARTRIJK, J.; BLOM-BARNHOORN, G. J. Adventitious bud formation from bul-scale explants of *Lillium speciosum* Thunb. *in vitro*: Effect of wounding, TIBA and temperature. **Z. Pflanzen-physiology**, Stuttgart, v. 100, p 355-363,1993.

ANGELOVA, Y., et al. Effects of the kinetin and 4PU-30 on the growth and the content of polyphenols in tobacco callus tissue. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, v. 27, n. (1-2), p. 36-42. 2001.

BACH, A. Micropropagation of *Hyacinthus* (*Hyacinthus orientalis* L.) In: Bajaj, Y. P. **Biotechnology in Agriculture and Foresry**: High-tech and micropropagation. Berlin: Springer-Verlang Berlin Heidelberg, 1992. v. 20, p. 144-159.

BELL, W. D. Aseptic culture of Amaryllis ovules and tissues. **Plant Life**, Pasadena, v. 29, p. 66-68, 1973.

BERGOÑON, S., et al. Efecto de diferentes tratamientos en la assepsia de explantos en especies de *Narcissus* y su influencia en la regeneración de brotes. In: Reunión Nacional de la S.E.F.V., 10 y Congresso Hispano-portugues de Fisiologia Vegetal, 3., Pamplona, 1993. **Anais...** Pamplona, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Regras para análise de Sementes**. Teste de tetrazólio. Brasília, 1992. p.139-144.

BROWN, J. T.; CHARLWOOD, B. V. Organogenesis in Callus culture. In: POLLAND, J. W.; WALKER, J. M. **Plant Cell and Tissue Culture**. Methods in Molecular Biology. New Jersey: The humana Press, 1990. v. 6, p 65-70.

BUNN, E.; DIXON, K. W. *In vitro* propagation methods for *Brandfordia grandiflora*, *Hibbertia miniata*, *Newcastelia chysophylla* and *Eucalyptus granitacula* (ms). In : International Association for plant tissue Culture-Australian Branch 5th Meeting. **Proceeding...**,1997. p. 157-163.

CASTRO, C. E. F.; MATHES, L. A. F. Propagação vegetativa *in vitro* de *Hippeastrum* spp. I. Fontes de explantes e esterilização eficientes. In : CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 6., Campinas, 1987. **Anais...** Campinas: SBFPO, 1987. p. 128 – 139.

CHEN, B. S.; LIN, C. H. Evaluation of waxapple leaf viability using improved 2,3,5 – trifenylyltetrazolium chloride reduction method. In: 25th INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS – SEED SYMPOSIUM, 1998, Pretoria. **Proceedings...** Pretoria: International Seed Testing Association, 1998. p.94.

ESAU, K. O Caule: estágio secundário de crescimento. In: **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgard Blucher, 1976. p. 186-200.

FOSKET, D. E. Biotic factors regulate some aspects of plant development. **Plant growth and development: a molecular approach**. 1. ed. California: Academic Press, 1994. p. 518-551.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by tissue culture: In Practice**. 2. ed. England: Exergetics, 1996. 1361p.

GERRITS, M. M., et al. Hormonal control of dormancy in tubers of *Lilium speciosum* cultured *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 325, p. 521-527, 1992.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T. Propagation by specialized stems and roots. In: **Plant Propagation: principles and practices**. 5 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1990. p.429-458.

HUANG, C. W., et al. Importance of two scale in propagating *Hippeastrum hybridum* by twin scaling. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 42, n. (1-2), p. 141-149, 1990.

HUSSEY, G. Totipotency in tissue explants and callus of some members of the Liliaceae, Iridaceae, and Amaryllidaceae. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 26, p. 253-262, 1975.

HUSSEY, G.; HARGREAVES, J. Multiplication of *in vitro* plantlets in bulbous species. **Ann Rep John Innes Inst.**, s.l., 1974 58-59. 1974.

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. 2 ed. New York: Mcgraw Hill. 1940. 523p.
KANEKO, Y.; MOROHASHI, Y. The effect of sodium hypochlorite treatment on the development of α -amilase activity in mung bean cotyledons. **Plant Science**, Shannon, v. 164, p. 287-292, 2003.

KRAUS, J. R.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Universidade Rural, Seropédica, 1997. 198p.

KRAUSE, J. Propagation of Hyacinth by leaf cuttings. Histological changes in leaf cuttings of *Hyacithus orientalis*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 109, p. 271-275, 1980.

KROMER, K. The effect of the light conditions on regeneration and level of endogenous growth regulators in *Muscari racemosum*/L./MILL. bulb-scale sections cultured *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 251, p. 173-182, 1988.

KROMER, K.; KUKUCZANKA, K. Control of morfogenesis in thin cell layer explants of *Muscari botryoides* Mill. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 325, p. 505-510, 1992.

LANGENS-GERRITS, M., et al. Hot-water tratament before tissue culture reduces initial contamination in *Lillium* and *Acer*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, p. 75-77, 1998.

LEAVEE, S.; AVIDAN, N.; PIERIK, R. L. M. Chlorogenic acid-an independent morphogenesis regulator or cofator. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 381, p. 405-412, 1994.

LORENZO, J. C., et al. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 65, p 1-8, 2001.

MARASCHIN, M. et al. Isolation and trans-resveratrol analysis in brazilian red wine by 1 H-nuclear magnetics resonancia. In: WEB, G. A. et al. **Magnetics resonance in food science – a view to the future**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001, p.136-141.

MARINANGELLI, P., et al. Influence of DB-cAMP, adenosine, forskolin, and traumatic acid on in vitro bulbing of *Lillium longiflorum*. **Hortscience**, Alexandria, v. 33, n. 1, p. 151-152. 1998.

MIELKE, K. A., ANDERSON, W. C. *In vitro* bublet formation in Dutch Iris. **Hortscience**, Alexandria, v. 24, n. 6, p. 1028-1031. 1989.

MII, M.; MORI, T.; IWASE, N. Organ formation from excised bulb scales of *Hippeastrum hybridum in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, London, v. 49, n. 3, p. 241-244. 1974.

MOHCALEÁN, P.; RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ, B. Effect of different benzyladenina time pulses on the endogenous levels of cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid in micropropagated explants of *Actinidia deliciosa*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Budapest, v. 41, p. 149-155. 2003.

MURASHIGE, T. ; NAKANO, R. T. The light requirement for shoot initiation in tobacco callus culture. **American Journal of Botany**, Columbus, v.55. 710p. 1968.

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

NIEDERWIESER, J. G.; NDOU, A. M. Review on adventitious bud formation in *Lachenaria*. **Acta horticulturae**, Wageningen, v. 570, p. 135-139, 2002.

NIEDERWIESER, J. G.; VCELAR, B. V. Regeneration of *Lachenalia* species from leaf explants. **Hortscience**, Alexandria, v. 26, n. 6. 684-687 p. 1990.

O'ROURKE, E. N., et al. Propagation of *Hippeastrum* from floral tissues by in vitro culture. **Herbertia**, Pasadena, v.47, n.1, p. 51-52, 1991.

OYAMADA, T. Propagation of Amaryllis (*Hippeastrum hybridum* Hort.) by tissue culture. I – Effect of auxins and cytokinins on the callus formation and organ differentiation in tissue culture of different parts of bulb scales. **Science Report of the Faculty of Agriculture**, Meijo, v.10, p.10-19, 1974.

PAEK, K. Y.; THORPE, T. A. *Hyacinth*. In: AMMIRATO, P. V., et al. **Handbook of Plant cell culture**. New York: McGraw-Hill, 1990, v. 5, 834 p.

PIERIK, R. L. M. Micropropagation of ornamental plants. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 289, p.45-54, 1991.

PRASAD, R. N.; CHATUVERDI, H. C. Rapid introduction of cloned plants of Amaryllis in long term culture. **Indian Journal of experimental Biology**, New Delhi, v. 31, n. 3, p. 242-246. 1993.

ROH, S. M. Propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. by leaf cuttings. **Hortscience**, Alexandria, v. 17, n.4. p. 607-609. 1982.

RYAN, D., et al. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 921, p. 147-176, 2002.

SAKER, M.; RADY, M.; EL-BAHR, M. Towards commercial production of ornamental bulb in vitro. **Egyptian Journal of Horticulture**, Cairo, v. 25, n. 1, p. 113-128. 1998.

SANIEWSKA, A., BUDZIANOWSKI, J. The nature of red pigment formed in wounded and infected *Hippeastrum* tissues by *Stagnospora curtisii* (Berk.) Sacc. (*Phoma narcissi*). **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.2, n. 430, p.843-849, 1997.

SANIEWSKA, A.; SANIEWSKI, M. Studies on the factor responsible for reddish colouration of mechanic injured tissue and tissue infected by fungus, *Stagonospora curtisii* (Berk.) Sacc. in *Hippeastrum x hybridum* Hort. **Folia Horticulturae**, Kraków, v. 4, n. 1, p. 3-9, 1992.

SANIEWSKI, M.; URBANEK, H.; PUCHALSKI, J. Wound-induced phenolic metabolism in scales of *Hippeastrum x hybridum*. Hort. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 325, p. 303-306, 1992.

SANIWESKA, A.; DYKI, B. Induction of red pigment in white petals of *Hippeastrum x Hybr.* Hort. during infection by *Phoma narcissi* (Aderh.) Boerema, De Gruyter et Noordel., comb. nov. and by mechanical injuries. **Acta Agrobotanica**, Warszawa, v. 50, n.1/2, p. 41-48, 1997.

SASS, J.E. **Botanical microtechnique**. 3. ed. Iowa: State Press, 1971. 326 p.

SEABROOK, J. A.; CUMMING, B. G. The *in vitro* propagation of Amaryllis (*Hippeastrum* spp. Hybrids). **In vitro**, Mariland, v. 13, n. 12, p.831-836, 1977.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of Society for Experimental Biology**, Cambridge, v.11, p.118-131, 1957.

SMITH, J. Micropropagation of the Gymea Lily. **Rural industries research & development corporation. 2000. 50 p.**

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. 3 ed. San Francisco: Freeman and Company, 1995. 887 p.

STANCATO, G. C., et al. Dry matter partitioning during the propagation of *Hippeastrum hybridum* as affected by light. **Scientia horticulturae**, Amsterdam, v. 62, p.81-87, 1995.

TAIPO, E. Red spot of Amaryllis caused by fungi. **Annals Agric. Fenn**, [sl], v. 5, p. 26-47, 1963.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3 ed. Massachusetts: Sinauer associates. 2002. 690p.

TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Regulation of organ formation by cytokinin and auxin in *Lilium* bulb scales growth *in vitro*. **Plant cell Physiology**, Tokyo, v. 23, n.1, p. 67-74, 1982.

TAMURA, S. Adventitious bud formation from excised hyacinth bulb scale *in vitro*. **Journal of Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v. 46, p. 501-508, 1978.

THORPE, T. A.; MURASHIGE, T. Starch accumulation in shoot forming tobacco callus cultures. **Science**, [sl], v. 160, p.421-422, 1968.

TOMBOLATO, A. F., et al. Micropropagação de *Hippeastrum hybridum* 'Apple Blossom' mediante escamas duplas. **Revista Brasileira de horticultura Ornamental**, Campinas, v. 7, n.1, p. 35-40, 2001.

ULRICH, M. R., et al. Micropropagation of *Crinum* 'Ellen Bosanquet' by tri-scales. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 82, p. 95-102, 1999.

VAHLKAMP, L. **Auxin-responsive genes: expression studies with the AtARCA gene and cDNA arrays**. 2000. 118 f.. Dissertation (Doktorgrades) Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät - Universität zu Köln. Amsterdam.

VAN AARTRIJK, J., BLOM-BARNHOORN, G.J. AND VAN DER LINDE, P.C.C. Effects of indole butyric acid and benzyladenine on the process of adventitious plantlet formation "*in vitro*" on bulb-scale explants of *Hyacinth*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 177, p.516-569, 1986.

VASIL, I. K.; THORPE, T. A. **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. 593 p.

VIDOR, M. A. **Micropropagación de *Hyacinthus amethystina* cv. 'Albus'**: Estudios morfogénicos. 1995. 253 f.. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola

Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidade Politécnica de Madrid. Madrid.

VIDOR, M. A. Técnicas assépticas para limpeza de bulbos de algumas ornamentais cultivadas *in vitro*. **Revista Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 10, n.2, p. 49-54, 1997.

YANAGAWA, T.; SAKANISHI, Y. Regeneration of the bublet on *Hippeastrum* bulb segments excised from various parts of a parent bulb. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v. 46, p. 250-260, 1977.

YANAGAWA, T.; SAKANASHI, Y. Studies on regeneration of excised bulb tissues of variuous tunicated-bulbous ornamentals. II Morphological observations on bublet formation from bul-scale segments. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**. Kyoto. v. 49, p. 119-126, 1980.

YANG, C.D.; CHONG, K.; JING, L. H. Relation between differentiation and phytohormones in scales of *Lilium daviaii*. **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v.11, n.4, p. 351-358. 1989.

ZAIDI, N., et al. Bulb and cormous monocotyledonous ornamental plants *In vitro*. **Quarterly Science Vision**, [sl], v. 6, n. 1, p. 58-73, 2000.

ZEEUW, C. Influence of exposure on the time of deep cork formation in three northeastern trees. **Syracuse University Buletin**, New York, v. 51, 1941.

ZIOUTI, A., et al. Cell wall-bound phenols in date palm leaves and roots. Identification and histochemical localization. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 381, p. 276-279, 1994.

CAPÍTULO 4 – INDUÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS DE EMBRIÕES IMATUROS E EM SEGMENTOS DE PLÂNTULAS DE *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae), *In Vitro*

1. RESUMO

Na cultura de tecidos, a regeneração de plantas a partir de calos possibilita a formação de grandes quantidades de plantas com um mínimo de manipulação e espaço físico do laboratório, reduzindo o custo de produção da planta micropropagada. Além disso, a variabilidade genética gerada *in vitro* quando as culturas passam pela fase de calo pode ser vantajosa para plantas ornamentais como *Hippeastrum aulicum* que possui um lento desenvolvimento vegetativo, tornando a introdução de um híbrido no mercado por meio de cruzamentos, muito demorada. Neste trabalho foi verificado o efeito de 0; 4; 10; 20; ou 40 μM de 2,4-D na indução de calos sobre segmentos de embriões e sobre segmentos de plântulas de *Hippeastrum aulicum*. Segmentos proximais e distais de embriões em dois diferentes estádios de desenvolvimento (embriões com eixo embrionário com 4mm ou com menos de 1mm de comprimento) e segmentos de folhas, bulbos (segmentos distais e proximais) e radículas de plântulas obtidas do desenvolvimento de embriões da espécie *in vitro*, foram inoculados em meio MS com as diferentes concentrações de 2,4-D e mantidos em sala de crescimento a 25 °C, em ausência de luz durante 120 dias. Culturas de segmentos proximais de embriões com eixo embrionário com menos de 1mm de comprimento são mais efetivas na produção de calos organogênicos que embriões com eixo embrionário com 4mm ou segmentos de plântulas. Para indução de calos em embriões imaturos de *H. aulicum* são necessárias concentrações iguais, ou abaixo de 10 μM de 2,4-D. Concentrações acima de 10 μM de 2,4 – D afetam negativamente a produção de calos.

2. ABSTRACT

Callus induction in immature embryos segments and in seedlings segments of *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae), *in vitro*

In tissue culture, plant regeneration from callus allows the formation of great quantities of plants with minimal manipulation and minimal laboratory physical space, reducing the production cost of micropropagated plant. Besides, genetical variability generated *in vitro* when cultures pass by the callus phase can be profitable for ornamental plants as *Hippeastrum aulicum* which possesses a slow vegetative development, making the introduction of an hybrid at the market by means of hybridizing, very delayed. In this work it was verified the effect of 0 μM ; 4 μM ; 10 μM ; 20 μM ; or 40 μM of 2,4-D in callus induction in embryo segments and in seedling segments of *Hippeastrum aulicum*. Distal and proximal embryo segments in two different stages of development (embryos with embryonic axis with 4mm length or less than 1 mm length) and leaf, bulbs (distal and proximal segments) and seedling rootlets obtained from *in vitro* germination from specie seeds, have been inoculated in MS media with different concentrations of 2,4-D and they were kept in a growth room at 25 °C, in absence of light during 120 days. Cultures with embryos' proximal segments with embryonic axis with less than 1 mm length are more effective in the production of organogenical callus than embryos with embryonic axis with 4mm or seedling segments. For callus induction in immature embryos of *H. aulicum*, equal concentrations or below of 10 μM of 2,4-D are needed. Concentrations above 10 μM of 2,4-D negatively affect callus production.

3. INTRODUÇÃO

Os calos são definidos como aglomerados de células não organizadas, irregularmente diferenciadas, que se multiplicam desordenadamente e se desenvolvem em resposta a injúrias químicas ou físicas. Os calos possuem a capacidade de se diferenciar em tecidos e órgãos (TORRES & CALDAS, 1990).

Na cultura de tecidos, a regeneração indireta de plantas a partir de calos tem sido vantajosa para um grande número de plantas, quando comparada com a formação direta de brotações sobre os explantes (BAJAJ, 1990). Grandes quantidades de plantas podem se formar a partir de calos, com um mínimo de manipulação e espaço físico do laboratório. Isto possibilita uma significativa redução no custo de produção da planta micropropagada (BAJAJ, 1990). Além disso, através da cultura de calos é possível o estudo de metabólitos secundários, além de ser pré-requisito para o desenvolvimento de sistemas de transformação genética (DECCETTI, 2000).

A desvantagem deste método é que a estabilidade genética ou uniformidade clonal pode não ser obtida devido à ocorrência de variação somaclonal a qual resulta em variantes fenotípicos. Entretanto, a variabilidade genética provocada quando as culturas passam pela fase de calo pode constituir-se em um fator positivo na micropropagação de plantas ornamentais para obtenção de variedades com características diferenciadas e desejáveis para seleção (HOKANSON & POOLER, 2000). Este aspecto é relevante para plantas bulbosas como *Hippeastrum aulicum*, a qual tem sido amplamente utilizada em programas de melhoramento nos países tradicionalmente produtores de bulbos ornamentais (HARDMAN, 1997). Plantas bulbosas, normalmente, demoram no mínimo 3 anos para a primeira floração o que torna a introdução de um híbrido no mercado, por meio de cruzamentos, muito demorada, podendo levar vários anos para que isto ocorra (DE HERTOUGH & LERNARD, 1993). Stimart et al. (1980) obtiveram variação somaclonal em plantas regeneradas a partir de calos de *Lilium*. Estes autores observaram que após 3 anos em cultura em meio líquido LS, suplementado com 2,4-D, 19% das plantas apresentaram variegação nas folhas.

Os principais fatores que influenciam a formação de calos são o tipo de explante, composição do meio nutritivo e as condições físicas de incubação, como luz e temperatura. Para indução a formação de calos, os melhores resultados são

obtidos com o uso de tecidos jovens, cujas células possuem maior potencial de crescimento e divisão, quando comparadas a células adultas (DECETTI, 2000). Embriões zigóticos são excelentes fontes de explante para indução de calos devido à sua natureza juvenil, o que confere alto potencial regenerativo (HU & FERREIRA, 1998). Embriões imaturos têm sido freqüentemente utilizados para indução de calos em diversas espécies, uma vez que o calo produzido a partir de embriões maduros, usualmente, não tem potencial morfogenético (OZIAS-ASKINS & VASSIL, 1983). Segundo Pinto et al. (1994), os calos formados a partir de tecidos jovens possuem maior potencial morfogenético para formar novos meristemas brotações de parte aérea e principalmente de radículas. Além disso, de acordo com Bell (1973), embriões imaturos de *Hippeastrum* apresentam altas taxas de sobrevivência *in vitro*. Entretanto, Hokanson & Pooler (2000) observaram que a capacidade de regenerar plantas a partir de calos obtidos de embriões maduros ou imaturos de cerejeiras ornamentais (*Prunus*) variou com a espécie.

Alguns explantes são recalcitrantes ao tratamento com reguladores de crescimento se não forem seccionados (GEORGE, 1996). Para a cultura de embriões, o embrião é excisado em segmentos proximal e distal para um maior controle das respostas *in vitro*. A maior produção de calos regenerativos em segmentos proximais de embriões foi relatada para *Brassica* (SHARMA, BHOJWANI, THORPE, 1991), *Capsicum* (ARROYO & REVILLA, 1991), *Olea* (MITRAKOS, ALEXAKI, PARADIMITRIOU, 1992), *Allium* (VAN DER VALK et al., 1992) e *Lycopersicon* (NOGUEIRA et al., 2001).

Os calos variam no seu potencial morfogênico. A morfologia, tamanho e cor do calo podem indicar sua capacidade morfogenética, os quais podem variar de compactos, friáveis ou nodulares; amarelo-creme ou brancos (GEORGE, 1996). Calos friáveis possuem maior capacidade meristemática que calos compactos (CID, 1998). Os calos friáveis apresentam maior proporção de substâncias pécticas e hemicelulósicas, com células de formato arredondado e de tamanho pequeno, enquanto que os compactos apresentam elementos mais diferenciados, tais como fibras, traqueídeos, células vacuoladas e com parede mais espessa (CID, 1998). Fatores como genótipo, período de cultura e composição do meio de cultura exercem influência no tipo de calo obtido (CID, 1998). Entretanto, diferenças no potencial morfogênico das células que compõe os tecidos também exercem

influência na aparência e/ou capacidade morfogênica dos calos, resultando no surgimento de diferentes tipos em um mesmo explante (GEORGE, 1996).

É provável que a característica de alta friabilidade seja favorecida por uma alta relação auxina/citocinina, bem como pela adição de outros componentes ao meio nutritivo (CID, 1998). Várias formulações minerais tais como MS, WH, LS e SH, acrescidas de substâncias reguladoras de crescimento, podem ser usadas na indução de calos friáveis (CID, 1998). Normalmente, os calos são induzidos utilizando-se uma auxina forte, como 2,4-D, apesar de que para algumas espécies o uso de citocininas utilizadas isoladamente (CID et al., 1999), ou em combinação com auxinas (DECETTI, 2000) também pode induzir a formação de calos.

Na indução de calos, é necessária a adição de auxinas em altas concentrações ao meio de cultura, para a maioria das monocotiledôneas (GONZALES-BENITO & ALDERSON, 1992). Estes autores observaram que adicionando 10 μM ou 20 μM de 2,4-D ao meio de cultura foi possível obter calos a partir de embriões maduros de *Alstroemeria* e que a presença de BAP inibiu a produção de calos. Em embriões zigóticos de *Allium cepa*, Zheng et al. (1998) promoveram a indução e crescimento de calos apenas com 4,5 μM e 10,0 μM de 2,4-D. Resultado semelhante foi obtido por Van Der Valk et al. (1992) que obtiveram calos a partir de embriões maduros de *Allium cepa* dentre outras espécies de *Allium*, utilizando meio MS suplementado com 5 μM de 2,4-D. A partir de explantes de bainha foliar de *Lilium*, Stimart et al. (1980) obtiveram calos capazes de regenerar plantas utilizando 20 μM de 2,4-D. A resposta ao suprimento exógeno de reguladores de crescimento é dependente do genótipo e conteúdo endógeno de fitormônio no tecido (VIETEZ & SAN-JOSÉ, 1996).

A indução de calos tem sido obtida *in vitro* com a utilização de reguladores de crescimento em diferentes concentrações e em explantes em diferentes estádios de crescimento. No entanto, poucos trabalhos foram encontrados sobre os fatores que controlam a indução de calos sobre explantes de plantas bulbosas. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na indução de calos em segmentos de embriões de *H. aulicum*, em diferentes estádios de crescimento, e em segmentos de plântulas obtidas da germinação de sementes *in vitro*, para posterior regeneração de plantas e propagação da espécie.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

4.1.2. Embriões imaturos

Foram utilizados frutos imaturos de *Hippeastrum aulicum*, medindo 3,7cm e 4,4 cm de diâmetro, colhidos ao acaso, em plantas localizadas em uma área da UCAD, Florianópolis, Santa Catarina (Figura 28). Após a coleta, em laboratório, os frutos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo, por 30 minutos para assepsia dos mesmos. Em câmara de fluxo laminar, os frutos foram imersos em etanol 70%, durante 1 minuto, para em seguida, serem transferidos para solução de hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo, durante 30 minutos. A seguir, foi feita uma rápida flambagem dos frutos na chama do bico de bunsen, para então serem abertos para retirada das sementes.



Figura 28 – Frutos imaturos de *H. aulicum*: com 4,4 cm (A) e 3,7 cm (B) de diâmetro. Barra=2cm.

As sementes foram removidas mediante corte transversal do fruto. Os embriões foram seccionados transversalmente em uma porção distal e outra, proximal. Os embriões provenientes dos frutos, medindo 3,7cm de diâmetro, possuíam eixo embrionário medindo menos de 1 mm de comprimento e foram classificados como estando no estágio 1 de desenvolvimento. Os embriões dos frutos com 4,4 cm de diâmetro possuíam eixo embrionário medindo cerca de 4 mm de comprimento, sendo estes classificados em estágio de desenvolvimento 2.

4.1.3. Segmentos de plântulas

Foram utilizadas as plântulas obtidas através do desenvolvimento dos embriões no estágio 1 e no estágio 2 de desenvolvimento, após 30 dias da inoculação em meio de cultura MS. Em câmara de fluxo laminar, as plântulas foram segmentadas em folhas, bulbos (metade distal e metade proximal) e radícula.

4.2. Indução de calos

As porções proximais e distais dos embriões e os segmentos das plântulas foram inoculados em placas de petri contendo meio de cultura MS, suplementado com 2,4-D nas concentrações de 0; 4; 10; 20; ou 40 μM . O estudo foi conduzido em sala de crescimento do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, do Centro de Ciências Agrárias, UFSC, onde as placas com as culturas foram mantidas no escuro a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.3. Delineamento experimental e avaliações

Para a indução de calos nos embriões no estágio 1 e 2 de desenvolvimento e nos segmentos de plântulas, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições compostas por cinco explantes cada.

Para os segmentos de embriões no estágio 1 e no estágio 2 de desenvolvimento, foram feitos registros após 15 dias da inoculação nos meios de cultura e as observações subseqüentes foram realizadas com intervalos de 30 dias. Foram avaliadas as porcentagens de contaminação e oxidação dos explantes de embriões, a porcentagem de germinação, caracterizada pela emissão da radícula, a

porcentagem de embriões que produziram calos e foram feitos registros referentes à textura e coloração dos calos formados sobre os embriões nos diferentes estádios de desenvolvimento. Além destes parâmetros, foram avaliadas as porcentagens de calos que diferenciaram raízes e bulbos.

Para os segmentos de plântulas, foi avaliada a porcentagem de explantes com calos após 90 e 120 dias da inoculação nos meios de cultura e feitos registros referentes à textura e coloração dos calos formados.

Os dados foram transformados em $\log(Y+1)$ e submetidos a análise da variância segundo Sokal & Rohlf (1995) através do programa STATGRAFICS. Quando observadas diferenças significativas as médias foram submetidas ao teste DMS, a 5% de probabilidade de erro.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Indução de calos em embriões imaturos

Neste trabalho, não foi constatada a contaminação nem a oxidação das culturas de segmentos proximais dos embriões em nenhum dos tratamentos. Nas culturas com os segmentos distais dos embriões, também não ocorreu contaminação, porém todas estes segmentos oxidaram e devido a isto foram descartados. Estes resultados corroboram com os que foram obtidos por Sharma, Bhojwani, Thorpe (1991); Arroyo & Revilla (1991); Mitrakos, Alexaki, Paradimitriou (1992); Van Der Valk et al. (1992) e Nogueira et al. (2001), que verificaram uma maior capacidade de regeneração *in vitro* dos segmentos proximais de embriões de *Brassica*, *Capsicum*, *Olea*, *Allium* e *Lycopersicon*, respectivamente. Segundo Sharma, Bhojwani, Thorpe (1991); Arroyo & Revilla (1991) e Nogueira et al. (2001), isto ocorre devido a um maior acúmulo de AIA na porção proximal do embrião em detrimento da porção distal. No entanto, Pedrotti, Label, Comu, (1993) verificaram que o aumento na concentração de AIA ocorreu na porção proximal de cotilédones de *Prunus avium* quando o eixo embrionário estava ausente indicando uma influência do eixo embrionário sobre a reação dos cotilédones. Assim sendo, no presente trabalho, a presença do eixo embrionário no segmento proximal dos embriões de *H. aulicum* pode ter influenciado as respostas observadas.

Independente do estágio de desenvolvimento dos embriões, as maiores porcentagens de germinação foram observadas nos meios de cultura sem 2,4-D e nos meios com as menores concentrações desta auxina (Tabela 8). No entanto, apenas os embriões nos meios de cultura sem auxina desenvolveram plântulas demonstrando que a auxina impediu o curso normal do desenvolvimento dos embriões. Aos 120 dias da inoculação, observou-se a emissão da radícula dos embriões no estágio 1, apenas nos tratamentos com 4 μM e 10 μM de 2,4 – D (Tabela 8). Nas concentrações de 20 μM e 40 μM de 2,4-D, os embriões neste estágio de desenvolvimento não emitiram a radícula demonstrando serem mais sensíveis a esta auxina nas concentrações mais elevadas. Nos embriões do estágio dois, a germinação ocorreu em todos os tratamentos (Tabela 8).

Tabela 8 – Porcentagem de embriões imaturos de *H. aulicum* que apresentaram emissão da radícula em função da concentração de 2,4-D e do período de cultura em meio Murashige & Skoog (1962).

2,4-D (μ M)	Compri- mento do eixo embrionário	Dias após a inoculação				
		15	30	60	90	120
0	< 1 mm	76,7a	93,3ab	-	-	-
4		36,7b	63,3abc	90,0a	96,7a	96,7a
10		0,0	16,67d	20,0c	50,0d	50,0c
20		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
40		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0	4 mm	72,0a	98,3a	-	-	-
4		0,0	43,3c	50,0ab	70,0b	76,7b
10		0,0	50,0bc	63,3ab	93,3a	70,0b
20		0,0	36,7c	36,7b	60,0c	50,0c
40		0,0	36,7c	40,0b	50,0d	53,3c
CV(%)		6,9	19,6	23,3	3,9	4,3

Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem significativamente pelo teste DMS, a 5% de probabilidade.

O desenvolvimento de plântulas ocorreu independentemente do estágio de desenvolvimento do embrião. Este resultado está de acordo com Brown et al. (1999). Segundo estes autores, embriões imaturos de *Hippeastrum* com menos de 1mm possuem altas taxas de sobrevivência *in vitro*, quando comparados com embriões imaturos de *Nerine*. Os autores observaram que embriões de *Hippeastrum* estão em um estágio de desenvolvimento mais avançado que embriões de *Nerine*, quando estes apresentam menos de 1mm, possibilitando o desenvolvimento de plântulas completas. O alto percentual de embriões imaturos que desenvolveram plântulas (aproximadamente 100%) corrobora com os valores de germinação de sementes de *H. aulicum* obtidas *in vivo* por FLORES, ALVES, PEDROTTI (2002). No entanto, o desenvolvimento de plântulas a partir de embriões imaturos de *H. aulicum in vitro* pode ser vantajoso, pois diminui o tempo para obtenção de plantas, tendo em vista que não é necessário aguardar a maturação completa do embrião.

O início da formação de calos foi verificado aos 60 dias, nos embriões no estágio 1, em meio de cultura com 4 µM de 2,4 – D (Tabela 9). Nos embriões no estágio 2 em 4,0 µM e 20,0 µM de 2,4 – D, observou-se um decréscimo na produção de calos aos 120 dias (Tabela 9). Com a utilização de 10,0 µM, as porcentagens de embriões neste estágio de desenvolvimento com calos foram idênticas às observadas aos 90 dias, sendo verificado um pequeno aumento com a utilização de 40 µM de 2,4 – D. Observou-se que os calos formados nos embriões no estágio 2 tornaram-se gradativamente marrons ao longo das subculturas e não progrediram. Pedrotti et al. (1992), observaram em embriões imaturos de *Prunus* que, quanto maior o crescimento do embrião, mais desenvolvidas são as conexões vasculares entre os cotilédones e eixo embrionário, ocasionando maior fluxo de nutrientes e substâncias de crescimento entre ambos. O maior fluxo de substâncias do cotilédone para os embriões de *H. aulicum* no estágio 2 de desenvolvimento pode ter interferido na resposta à auxina adicionada ao meio para formação de calos friáveis.

Tabela 9 – Porcentagem de embriões imaturos de *H. aulicum* que produziram calos em função das concentrações de 2,4 –D e do período de cultura em meio Murashige & Skoog (1962).

2,4-D (µM)	Comprimento do eixo embrionário	Dias após a inoculação		
		60	90	120
4	< 1 mm	56,67a	93,33a	96,67a
10		0,0	20,00bc	50,00ab
20		0,0	0,0	0,0
40		0,0	0,0	0,0
4	4 mm	0,0	26,67ab	23,33bc
10		0,0	16,67bc	16,67c
20		0,0	20,00bc	10,00c
40		0,0	10,00c	16,67c
CV(%)		0,20	30,82	30,13

Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem significativamente pelo teste DMS, a 5% de probabilidade.

Em ambos os estádios de desenvolvimento, observou-se que com a concentração de 4 μM de 2,4-D foram obtidas as maiores porcentagens de embriões com calos (Tabela 9). Estes dados são semelhantes aos obtidos por Van Der Valk et al. (1992) na indução de calos em embriões zigóticos de *Allium*, e por Wang et al. (1999) para indução de calos em rizomas de *Iris*. Suplementando o meio de cultura MS com 5 μM de 2,4-D, ambos os autores obtiveram a maior produção de calos. Os resultados obtidos no presente trabalho contrariam a constatação de Gonzales-Benito & Alderson (1992), de que para a indução de calos em monocotiledôneas são necessárias altas concentrações de auxina. Estes autores obtiveram calos a partir de embriões de *Alstroemeria* utilizando concentrações de 10 μM ou 20 μM de 2,4-D ao meio de cultura. No presente trabalho, as concentrações de 20 ou 40 μM de 2,4-D provavelmente foram fitotóxicas para os embriões de *H. aulicum*, determinando uma redução na porcentagem dos que produziram calos.

Nos tratamentos em que foram obtidos calos a formação ocorreu sobre a radícula (Figura 29). Aos 60 dias os calos nos embriões no estágio 1 apresentaram textura nodular e com coloração amarelo creme (Figura 30 – A). Aos 90 dias, o padrão morfológico dos calos variou, sendo formados calos de textura granular, com cores variando do amarelo, branco e translúcido em um mesmo explante (Figura 30 – B). A formação de calos com diferentes morfologias em um mesmo explante pode ter ocorrido devido às diferenças no potencial morfogênico das células que compõe os tecidos, segundo George (1996). Os embriões no estágio 2, aos 60 dias da inoculação em meio de cultura, apresentavam apenas emissão da radícula (Figura 30 – C), formando calos apenas depois de 90 dias neste meio de cultura. Os calos produzidos pelos embriões no estágio 2 apresentavam um padrão morfológico uniforme, predominando calos compactos e amarelos (Figura 30 - D). Segundo Cid (1998), calos compactos apresentam elementos mais diferenciados, possuindo pouca capacidade meristemática. O desenvolvimento mais avançado dos embriões no estágio 2, possivelmente os tornou menos receptivos a indução do 2,4-D, não ocorrendo o estabelecimento da competência para formação de calos friáveis.



Figura 29 – Formação de calos sobre radícula de embriões imaturos de *H. aulicum*, com eixo embrionário com menos de 1mm de comprimento, aos 60 dias de cultura, em meio Murashige & Skoog (1962) com 4 μ M de 2,4-D. Barra = 0,5 mm

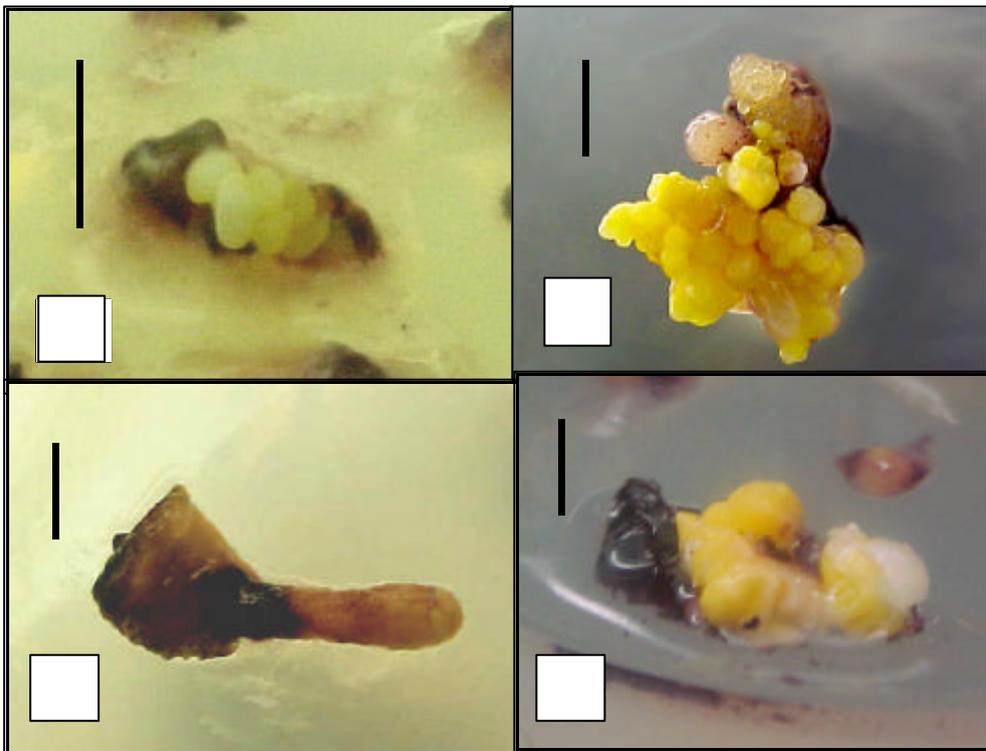


Figura 30 – Embriões de *H. aulicum* em meio Murashige & Skoog (1962) com 4 μ M de 2,4 – D: A) Calos obtidos em embriões com menos de 1 mm de comprimento do eixo embrionário aos 60 dias, B) e aos 90 dias da inoculação; C) Emissão da radícula de embriões com 4 mm de comprimento de eixo embrionário aos 60 dias, D) e formação de calos aos 90 dias da inoculação em meio de cultura. Barra=0,5cm.

Nos calos formados a partir dos embriões no estágio 1, foi observada a produção de raízes independente da concentração de auxina utilizada (Tabela 10 e Figura 31 - B). Segundo Ozias-Askins & Vassil (1983), as células que compõem calos friáveis possuem uma tendência fisiológica a formar primórdios radiculares, não sendo manifestada nos estágios iniciais de crescimento do calo. Mitrakos, Alexaki, Papadimitriou (1992) correlacionaram o aumento na rizogênese em calos obtidos de segmentos cotiledonares de *Olea* com o prolongamento do tempo de cultura dos mesmos. No presente trabalho, aos 90 dias foi observada a produção de raízes nos calos formados a partir dos embriões no estágio 1 de desenvolvimento, aumentando significativamente aos 120 dias (Tabela 10).

Tabela 10 – Porcentagem de calos com raízes e porcentagem de calos com produção de bulbos, aos 90 e aos 120 dias da inoculação de embriões de *Hippeastrum aulicum*, com eixo embrionário medindo menos de 1mm de comprimento, em meio de cultura Murashige & Skoog (1962) com diferentes concentrações de 2,4-D.

2,4-D (μ M)	Porcentagem de calos que diferenciaram raízes		Porcentagem de calos com produção de bulbos	
	Dias após inoculação dos embriões			
	90	120	90	120
4	26,67ns	80,00ns	0,0	13,33ns
10	30,00ns	76,67ns	0,0	6,67ns
CV (%)	34,74	24,07	-	42,23

Aos 120 dias também foi observada a diferenciação de bulbos nos tratamentos com o embrião no estágio 1 nos meios de cultura com 4 μ M e 10 μ M de 2,4-D (Tabela 10 e Figuras 31 – B). A formação de raízes também tem sido observada antes da formação de brotações em calos friáveis de trigo (OZIAS-ASKINS & VASSIL, 1983) e antes de ocorrer embriogênese somática em calos de segmentos de embriões imaturos de *Olea* (ORINOS & MITRAKOS, 1991; MITRAKOS, ALEXAKI, PARADIMITRIOU, 1992). No presente trabalho, a adição de 2,4 –D ao meio de cultura pode ter exercido alguma influência sobre a diferenciação

de bulbos, tendo em vista que vários autores (MII, MORI, IWASE, 1974; HUSSEY, 1975; PRASAD & CHATUVERDI, 1993) têm relacionado a presença de auxina com a formação de bulbos *in vitro* em diversas espécies bulbosas.

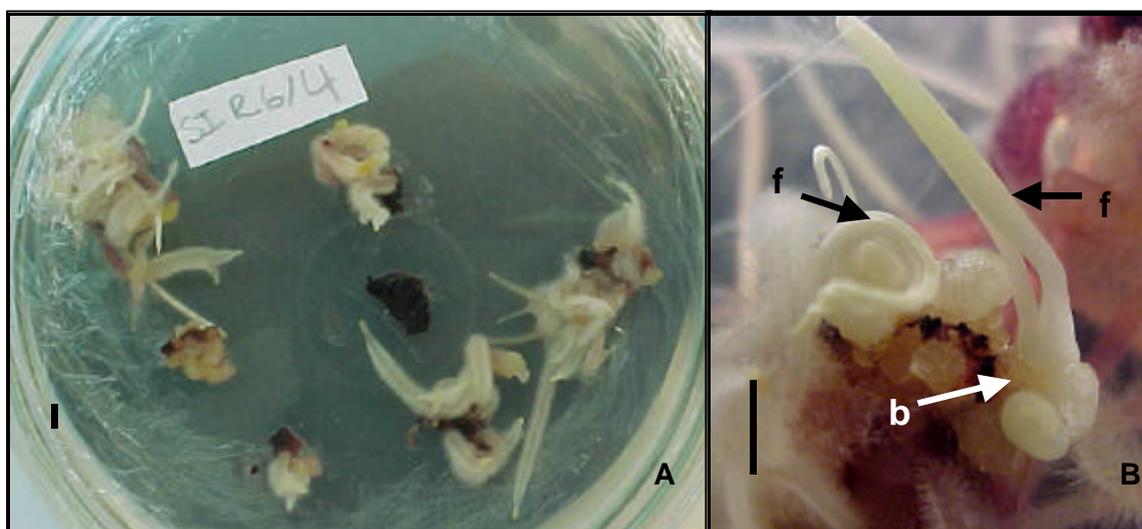


Figura 31 – Morfogênese em calos formados em embriões de *H. aulicum* com eixo embrionário medindo menos de 1mm de comprimento, em meio MS suplementado com 4 μ M de 2,4 - D: A) Rizogênese partir dos calos aos 90 dias; B) Diferenciação de bulbos aos 120 dias; b=bulbos; f=folhas. Barra=0,5 cm.

5.2. Indução de calos em segmentos de plântulas

Dentre os segmentos de plântulas, apenas os explantes provenientes da metade proximal do bulbo apresentaram produção de calos após 90 dias da inoculação em meio contendo 2,4-D, sem diferença significativa entre as concentrações utilizadas (Tabela 11 e Figura 32). Segundo Paek & Thorpe (1990), explantes constituídos por segmentos proximais da bainha foliar inseridos em uma porção de caule são a fonte de material mais utilizado na cultura de tecidos de plantas bulbosas. A presença de tecidos meristemáticos (SEABROOK, 1990) e o intenso transporte de reguladores de crescimento a partir do caule (OKUBO, HUANG, KISHIMOTO, 1999) conferem a maior capacidade morfogênética a estes explantes. Entretanto, o aspecto dos calos formados a partir dos segmentos de bulbo de *Hippeastrum aulicum* observado neste trabalho foi de textura compacta e de coloração amarela, semelhante aos calos formados nos embriões no estágio 2,

denotando uma baixa capacidade morfogênica. Para os demais segmentos de plântulas a auxina foi fitotóxica, evidenciada pela necrose observada nos tecidos.

Tabela 11 - Porcentagem de explantes de segmentos de bulbo (metade proximal) de *Hippeastrum aulicum*, que produziram calos após 90 dias de cultura em meio de cultura MS, com diferentes concentrações de 2,4-D.

2,4-D (μM)	Porcentagem de explantes que produziram calos
4	13,33ns
10	23,33ns
20	20,00ns
40	10,00ns
CV (%)	23,49



Figura 32 – Produção de calos em segmentos proximais de bulbos de plântulas obtidas de embriões imaturos de *H. aulicum* (com eixo embrionário medindo 4 mm e menos de 1mm) após 90 dias de cultura meio Murashige & Skoog (1962) suplementado com 4 μM de 2,4-D. Legenda: r=raiz; b=bulbo; c=calo. Barra = 0,5 cm.

Nos explantes provenientes na base da metade proximal do bulbo, foi observado o desenvolvimento de um sistema radicular (Figura 32). Isto demonstra que apesar da presença de 2,4-D no meio de cultura, esta porção do bulbo se

manteve em uma rota de desenvolvimento normal e que o estímulo fornecido pelo 2,4-D do meio de cultura pode não ter sido suficiente para induzir calos organogênicos. Conforme observado nos segmentos proximais dos embriões em estágio 2 de desenvolvimento, o estágio fisiológico pode ter influenciado na morfologia e na capacidade organogênica dos calos formados nos segmentos de plântulas, como observado por Hokanson & Pooler (2000) em segmentos de embriões de *Prunus*. Calos formados a partir de tecidos mais jovens possuem maior potencial para emitir brotações, principalmente radículas, ao contrário dos calos produzidos a partir de tecidos maduros, que usualmente não tem potencial morfogenético (OZIAS-ASKINS & VASSIL, 1983; PINTO et al., 1994). No presente trabalho a morfologia do calo foi um indicativo de sua capacidade morfogenética, conforme descrito por George (1996).

6. CONCLUSÕES

- Embriões imaturos de *Hippeastrum aulicum*, com eixo embrionário medindo menos de 1 mm de comprimento, possuem maior capacidade de produzir calos organogênicos que embriões com eixo embrionário medindo 4 mm, quando em cultura em meio MS, com as concentrações de 2,4-D testadas no presente trabalho;
- Para indução de calos em embriões imaturos de *H. aulicum* são necessárias concentrações menores que 10 μM de 2,4-D, visto que concentrações acima de 10 μM de 2,4 – D afetam negativamente a produção de calos;
- Culturas de segmentos proximais de embriões provenientes de frutos imaturos são mais efetivas na produção de calos organogênicos que segmentos de plântulas.

7 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARROYO, R. & REVILLA, A. *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. **Plant Cell Reports**, Springer-Verlag, v. 10, p. 414-416, 1991.

BAJAJ, P. S. *Freesia*. In: AMMIRATO, P. V., et al. **Handbook of plant cell culture**. New York: McGraw – Hill, 1990. v. 5, p. 413 – 428.

BELL, W. D. Aseptic culture of *Amaryllis* ovules and tissues. **Plant Life**, Pasadena, v. 29, p. 66-68, 1973.

BROWN, N. R., et al. Reproductive biology of *Nerine* (Amaryllidaceae) II: Embryo development and seed germination. **Herbertia**, Pasadena, v.54. 153-170p. 1999.

CID, L. P. B. Suspensão celular. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. v.1, p 331 - 353.

DE HERTOGH, A.; LE NARD, M. **The physiology of flower bulbs**. The Netherlands: Elsevier, 1993. 811p.

DECETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 f.. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FLORES, P. S.; ALVES, A. C.; PEDROTTI, E. L. Análise do potencial germinativo de *Begonia* sp, *Sinningia leopoldii* e *Hippeastrum aulicum*. In: Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, 14., 2002, Rio Claro. **Anais...**Rio Claro: Fundação Editora UNESP, 2002. CD-ROM.

GEORGE, E. F.. **Plant Propagation by tissue culture: In Practice**. 2ed. Edington: Exergetics, 1996. 1361p.

GONZALES-BENITO, M. E.; ALDERSON, P. G.. Callus induction and plant regeneration in *Alstroemeria*. **Journal of experimental Botany**, Oxford, v. 43, n. 247, p. 205-211, 1992.

HARDMAN, C. Trends in modern *Hippeastrum* hybridizing. **Herbertia**, Pasadena, V.52, p. 168-178, 1997.

HOKANSON, K. E.; POOLER, M. R. Regeneration of ornamental cherry (*Prunus*) taxa from mature stored seed. **Hortscience**, Alexandria, v.35, n.4, p.745-748, 2000.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. v. 1, p 371-393.

HUSSEY, G. Totipotency in tissue explants and callus of some members of the Liliaceae, Iridaceae, and Amaryllidaceae. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 26, p. 253-262, 1975.

MII, M.; MORI, T.; IWASE, N. Organ formation from excised bulb scales of *Hippeastrum hybridum in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, London, v. 49, n. 3, p. 241-244. 1974.

MITRAKOS, K.; ALEXAKI, A.; PAPADIMITRIOU, P. Dependence of olive morphogenesis on callus origin and age. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 139, p. 269-273, 1992.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p.473-479, 1962.

NOGUEIRA, F. T. S., et al. Regeneração *in vitro* de plantas de tomateiro 'Santa Clara' e seu mutante natural 'Firme'. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v. 25, n.1, p.63-71, 2001.

OKUBO, H; HUANG, C. W.; KISHIMOTO, F. Effects of anti-auxins and basal plate on budlet formation in scale propagation of amaryllis (*Hippeastrum x hybridum* Hort.). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v. 68, n.3, p.513-518, 1999.

ORINOS, T & MITRAKOS, K. Rhizogenesis and somatic embryogenesis in calli from wild olive (*Olea europea* var. *Sylvestris* (Miller) Lehr mature zygotic embryos. . **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.27, p.183-187, 1991.

OZIAS-ASKINS, P.; VASSIL, I. K. Improved efficiency and normalization of somatic embryogenesis in *Triticum aestivum* (wheat). **Protoplasma**, Springer Verlag, New York, v. 117, p.40-44, 1983.

PAEK, k. Y.; THORPE, T. A. *Hyacinth*. In: AMMIRATO, P. V., et al. **Handbook of plant cell culture**. New york: Mcgraw – Hill, 1990. v. 5, p. 413 – 428.

PEDROTTI , E. L., et al. Morphogenic response on wild cherry (*Prunus avium* L.) immature embryos. In *Mass production technology for improved fast growing forest tree species*. In: Proceedings of Symposium Bourdoaux, Bordoaux, p.67-72. 1992.

PEDROTTI, E. L.; LABEL, P.; COMU, D. Teores endógenos em auxinas e citocininas em embriões zigóticos imaturos de cerejeira (*Prunus avium* L.). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. Resumos do IV Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. Ceará. Londrina, V.5, n.1, p. 144.1993.

PINTO, J. E. B. P., et al. Uso de diferentes explantes e concentrações de Benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n.6, p. 867-873, 1994.

PRASAD, R. N.; CHATUVERDI, H. C. Rapid introduction of cloned plants of *Amaryllis* in long term culture. **Indian Journal of experimental Biology**, New Delhi, v. 31, n. 3, p. 242-246. 1993.

SHARMA, K. K.; BHOJWANI, S. S.; THORPE, T. A. The role of cotyledonary tissue in the differentiation of shoots and roots from cotyledon explants of *Brassica juncea* (L.) Czern. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.24, p.55-59, 1991.

SEABROOK, J. E. A. *Narcissus* (Daffodil). In: AMMIRATO, P. V., et al. **Handbook of plant cell culture**. New york: Mcgraw – Hill, 1990. v. 5, p. 413 – 428.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. 3 ed. San Francisco: Freeman and Company, 1995. 887 p.

STIMART, D. P., et al. Plants from callus of the interpecific hybrid *Lilium* 'Black Beauty'. **Hortscience**, Alexandria, v.15. n.3, p. 313-315, 1980.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos em plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPH, 1990. 433p.

VAN DER VALK, P., et al. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived callus of three *Allium* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.30, p.181-191, 1992.

VIETEZ, A M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. **In Vitro Cellular Developmental Biology**, Columbia, v.32, p.140-147, 1996.

ZHENG, S., et al. Factors influencing induction, propagation and regeneration of mature zygotic embryo-derived callus from *Allium cepa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.53, p. 99-105, 1998.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A exploração econômica de muitas espécies nativas ornamentais tem sido limitada, dentre outros fatores, pela falta de informações sobre as necessidades de cultivo das mesmas. Não foram encontradas informações sobre o cultivo da espécie *Hippeastrum aulicum* na literatura, apesar de ser uma planta cultivada há algumas décadas em outros países. No Brasil, as informações sobre o cultivo da espécie, limitam-se ao conhecimento informal dos floricultores. Neste sentido, os resultados obtidos no presente trabalho são relevantes, pois além de fornecer suporte científico ao conhecimento informal existente, abrem novas perspectivas na utilização das técnicas de germinação de sementes, estaquia de bainhas foliares e cultura *in vitro* para a propagação da espécie.

O emprego de sementes como fonte de propágulo pode ser útil para propagação da espécie, além de auxiliar na manutenção da diversidade genética observada nas populações naturais. Os resultados obtidos no presente estudo sobre a germinação de sementes demonstraram que *Hippeastrum aulicum* apresenta um grande potencial adaptativo a diferentes ambientes, pois apresentaram elevada porcentagem de germinação nas diferentes condições ambientais testadas. Novos estudos podem ainda ser conduzidos para verificar a temperatura limite para germinação das mesmas.

Por outro lado, a utilização das técnicas de micropropagação e estaquia de bainhas foliares poderia otimizar a clonagem de genótipos superiores. Estas técnicas de propagação vegetativa foram eficientes ao aumentar o número de propágulos da espécie, superando os valores obtidos com a multiplicação vegetativa natural.

Os resultados do experimento com a estaquia de bainhas foliares aqui obtidos validam observações dos agricultores de que o enraizamento ou produção de bulbos nas estacas de *H. aulicum* ocorre mesmo sem a adição de reguladores de crescimento. No entanto, observou-se que com a utilização de ANA houve um aumento nos números de bulbos e de raízes por estaca, sendo este último, um fator determinante para a sobrevivência das estacas quando transferidas para o campo. Entretanto, o aumento no número de bulbos e no número de raízes ocorreu em concentrações distintas de ANA, não sendo obtido um tratamento que aumentasse

ambos os parâmetros. Novos estudos poderiam ser conduzidos para avaliar o efeito de diferentes concentrações e/ou tipos de auxinas, para o aumento do enraizamento e bulbificação das estacas. Adaptações da metodologia proposta na literatura para estaquia de bainhas foliares também poderiam ser feitas para aprimorar a estaquia de bainhas foliares de *H. aulicum*. Novos estudos como a aplicação de diferentes concentrações em diferentes fases da estaquia poderiam superar as deficiências observadas com a utilização da metodologia de estaquia de bainhas foliares convencional.

No presente estudo foi demonstrado que a micropropagação é uma técnica viável para propagação de *H. aulicum*. No entanto, por ser uma técnica que depende do controle de um grande número de variáveis, são necessários estudos complementares até que seja estabelecido um eficiente protocolo de micropropagação, sendo que o presente estudo poderá servir de base para os demais. Com as concentrações de ANA e BAP utilizadas na micropropagação de *H. aulicum* foram obtidas altas taxas de multiplicação, quando comparadas com valores obtidos por outros autores. Novos estudos utilizando-se técnicas para quebra da dominância apical das brotações, ou a utilização de sistemas de imersão temporária, poderiam ser conduzidos para aumentar o número de brotações obtidas. Além disso, estudos para verificar a correlação entre a posição das bainhas no bulbo com a sobrevivência dos explantes *in vitro*, ou se a sobrevivência dos explantes foi influenciada pela termoterapia como relatado por alguns autores para outras espécies, poderiam aumentar a eficiência da micropropagação.

A produção de compostos fenólicos durante o a propagação *in vitro* também abre perspectivas para novos estudos para investigar a participação dos mesmos no processo morfogênico. Os resultados do estudo histológico sobre a origem do processo morfogênico revelaram a existência de uma polaridade das respostas nas bainhas foliares de *H. aulicum in vitro* que pode estar associada a proximidade dos feixes vasculares com a região do tecido onde as brotações foram formadas. Estudos complementares sobre a polaridade também são relevantes para maior controle das respostas *in vitro*.

No presente trabalho, também foi verificado que é possível a produção de calos morfogênicos em segmentos proximais de embriões em estádios iniciais de desenvolvimento, em meio de cultura suplementado com baixas concentrações de 2,4-D. Estudos complementares para o estabelecimento de um protocolo de

obtenção de mudas a partir de calos, poderiam ser conduzidos com base nos resultados obtidos. No entanto, é necessário aprimorar o meio para indução dos calos e o estabelecimento de meios para o crescimento dos calos bem como estabelecer meios para regeneração das plantas *in vitro*. Um sistema de propagação através de calos pode representar uma alternativa para redução no custo de produção da muda. Além disso, sistemas de transformação genética de plantas bulbosas a partir de culturas de calos podem representar uma alternativa aos sistemas convencionais de melhoramento por meio de cruzamentos que pode levar vários anos para estas espécies devido ao lento crescimento vegetativo.

ANEXO I – QUADROS DAS ANÁLISES DA VARIÂNCIA REFERENTES AO CAPITULO 1 - GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae)

1– PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (Dados transformados em log (y+1); ns=não significativo; (*)= significativo a 5% de probabilidade de erro)

1.1 - PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO NO 2º DIA APÓS A SEMEADURA

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Temperatura	0,069	2	0,035	2,297	0,143ns
Luz	8,013	1	8,013	530,880	0,000*
Interação	0,069	2	0,035	2,297	0,143ns
Erro	0,271	18	0,015		

CV (%) = 18,28

1.2 - PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO NO 4º DIA APÓS A SEMEADURA

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Temperatura	2,371	2	1,185	114,610	0,000*
Luz	2,856	1	2,856	276,243	0,000*
Interação	0,414	2	0,207	20,004	0,000*
Erro	0,186	18	0,010		

CV (%) = 8,92

1.3 - PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO NO 6º DIA APÓS A SEMEADURA

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Temperatura	0,652	2	0,326	12,036	0,001*
Luz	0,876	1	0,876	32,330	0,000*
Interação	0,087	2	0,044	1,613	0,241ns
Erro	0,487	18	0,027		

CV (%) = 11,49

1.4 - PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO NO 8º DIA APÓS A SEMEADURA

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Temperatura	0,943	2	0,471	57,433	0,000*
Luz	0,304	1	0,304	37,072	0,000*
Interação	0,0004	2	0,0002	0,024	0,976ns
Erro	0,148	18	0,008		

CV (%) = 5,52

1.5 - PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO NO 10º DIA APÓS A SEMEADURA

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Temperatura	0,913	2	0,456	56,729	0,000*
Luz	0,117	1	0,117	14,520	0,003*
Interação	0,004	2	0,002	0,237	0,793ns
Erro	0,145	18	0,008		

CV (%) = 5,20

1.6 - PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO NO 11º DIA APÓS A SEMEADURA

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Temperatura	0,799	2	0,399	64,691	0,000*
Luz	0,071	1	0,071	11,493	0,005*
Interação	0,008	2	0,004	0,652	0,539ns
Erro	0,111	18	0,006		

CV (%) = 4,33

1.7 - PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO NO 12º DIA APÓS A SEMEADURA

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Temperatura	0,667	2	0,334	106,854	0,000*
Luz	0,038	1	0,038	12,258	0,004*
Interação	0,011	2	0,005	1,544	0,253ns
Erro	0,056	18	0,003		

CV (%) = 2,99

1.8 - PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO NO 13º DIA APÓS A SEMEADURA

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Temperatura	0,636	2	0,318	76,363	0,000*
Luz	0,014	1	0,014	3,338	0,093ns
Interação	0,014	2	0,007	1,736	0,218ns
Erro	0,075	18	0,004		

CV (%) = 8,19

2 - VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (Dados transformados em log (y+1); ns=não significativo; (*)= significativo a 5% de probabilidade de erro)

2.1- VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO NO 2º DIA APÓS A SEMEADURA

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Temperatura	0,062	2	0,031	2,284	0,144ns
Luz	5,024	1	5,024	370,050	0,000*
Interação	0,062	2	0,031	2,284	0,144ns
Erro	0,244	18	0,013		

CV (%) = 22,05

2.2 - VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO NO 4º DIA APÓS A SEMEADURA

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Temperatura	0,660	2	0,330	292,670	0,000*
Luz	2,184	1	2,184	1936,596	0,000*
Interação	0,002	2	0,0009	0,768	0,485ns
Erro	0,020	18	0,001		

CV (%) = 5,46

2.3 - VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO NO 6º DIA APÓS A SEMEADURA

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Temperatura	0,661	2	0,330	1166,294	0,000*
Luz	1,032	1	1,032	3642,373	0,000*
Interação	0,015	2	0,008	27,078	0,000*
Erro	0,005	18	0,0003		

CV (%) = 6,22

2.4 - VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO NO 8º DIA APÓS A SEMEADURA

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Temperatura	0,636	2	0,318	54,608	0,000*
Luz	0,211	1	0,211	36,283	0,000*
Interação	0,001	2	0,0005	0,089	2,916ns
Erro	0,105	18	0,006		

CV (%) = 9,61

2.5 - VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO NO 10º DIA APÓS A SEMEADURA

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Temperatura	0,611	2	0,306	51,283	0,000*
Luz	0,077	1	0,077	12,977	0,004*
Interação	0,0005	2	0,0003	0,046	0,956ns
Erro	0,107	18	0,006		

CV (%) = 9,70

2.6 - VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO NO 11º DIA APÓS A SEMEADURA

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Temperatura	0,553	2	0,276	62,429	0,000*
Luz	0,047	1	0,047	10,620	0,007*
Interação	0,004	2	0,002	0,396	0,681ns
Erro	0,081	18	0,004		

CV (%) = 23,95

2.7 – VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO NO 12º DIA APÓS A SEMEADURA

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Temperatura	0,505	2	0,252	93,068	0.000*
Luz	0,024	1	0,024	8,926	0,011*
Interação	0,005	2	0.003	1,002	0,396ns
Erro	0,049	18	0.003		

CV (%) = 6,22

2.8 - VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO NO 13º DIA APÓS A SEMEADURA

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Temperatura	0,529	2	0,264	81,505	0.000*
Luz	0.015	1	0.015	4,454	0.057ns
Interação	0,004	2	0,002	0,683	0,524ns
Erro	0,0583992	18	0,003		

CV (%) = 6,78

ANEXO II – QUADROS DAS ANÁLISES DA VARIÂNCIA REFERENTES AO CAPITULO 2 – PROPAGAÇÃO DE *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae) ATRAVÉS DE BAINHAS FOLIARES

(Dados transformados em log (y+1); ns=não significativo; *)= significativo a 5% de probabilidade de erro)

1 – PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DAS ESTACAS DE BAINHAS FOLIARES CENTRAIS E PERIFÉRICA TRATADAS COM 4 CONCENTRAÇÕES DE ANA E AIB

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
(A) Posição da estaca	7.560	1	7.560	867.358	0.000*
(B) Auxina	1.284	1	1.284	147.281	0.000*
(C) Concentração	16.527	3	5.509	631.995	0.000*
Interação					
A X B	0.065	1	0.065	7.488	0.010*
A X C	2.984	3	0.995	20.501	0.000*
B X C	0.536	3	0.179	114.119	0.000*
A X B X C	1.776	3	0.592	67.899	0.000*
Erro	0.279	32	0.009		

CV (%) = 8,01

2 – PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO DE ESTACAS DE BAINHAS FOLIARES CENTRAIS PERIFÉRICAS TRATADAS COM 4 CONCENTRAÇÕES DE ANA E AIB

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
(A) Posição da estaca	5.122	1	5.122	421.575	0.000*
(B) Auxina	2.679	1	2.679	220.500	0.000*
(C) Concentração	4.071	3	1.357	111.690	0.000*
Interação					
A X B	1.821	1	0.607	49.919	0.000*
A X C	0.653	3	0.653	53.772	0.000*
B X C	1.627	3	0.542	44.639	0.000*
A X B X C	1.102	3	0.367	30.235	0.000*
Erro	0.389	32	0.012		

CV (%) =7,71

3 – NÚMERO DE RAÍZES POR ESTACA DE BAINHAS FOLIARES CENTRAIS PERIFÉRICAS TRATADAS COM 4 CONCENTRAÇÕES DE ANA E AIB

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
(A) Posição da estaca	0,371	1	0,371	173,065	0,000*
(B) Auxina	0,211	1	0,211	98,274	0,000*
(C) Concentração	0,224	3	0,075	34,755	0,000*
Interação					
A X B	0,124	1	0,124	57,858	0,000*
A X C	0,176	3	0,059	27,420	0,000*
B X C	0,207	3	0,069	32,224	0,000*
A X B X C	0,233	3	0,078	36,299	0,000*
Erro	0,069	32	0,002		

CV (%) =15,81

4 – COMPRIMENTO DAS RAÍZES POR ESTACA DE BAINHAS FOLIARES CENTRAIS PERIFÉRICAS TRATADAS COM 4 CONCENTRAÇÕES DE ANA E AIB

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
(A) Posição da estaca	0,169	1	0,169	73,841	0,000*
(B) Auxina	0,261	1	0,261	113,281	0,000*
(C) Concentração	0,542	3	0,181	78,818	0,000*
Interação					
A X B	0,0004	1	0,0004	0,154	0,709ns
A X C	0,155	3	0,052	22,563	0,000*
B X C	0,194	3	0,065	28,238	0,000*
A X B X C	0,272	3	0,091	39,572	0,000*
Erro	0,073	32	0,002		

CV (%) =13,55

4 – PORCENTAGEM DE BULBIFICAÇÃO DAS ESTACA DE BAINHAS FOLIARES CENTRAIS PERIFÉRICAS TRATADAS COM 4 CONCENTRAÇÕES DE ANA E AIB

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
(A) Posição da estaca	3,814	1	3,814	426,219	0,000*
(B) Auxina	0,553	1	0,553	61,752	0,000*
(C) Concentração	8,788	3	2,929	327,366	0,000*
Interação					
A X B	0,016	1		1,762	0,194ns
A X C	1,378	3	0,459	51,333	0,000*
B X C	0,823	3	0,274	30,677	0,000*
A X B X C	0,140	3	0,047	5,233	0,005*
Erro	0,286	32	0,009		

CV (%) = 12,44

5 – NÚMERO DE BULBOS POR ESTACA DE BAINHAS FOLIARES CENTRAIS PERIFÉRICAS TRATADAS COM 4 CONCENTRAÇÕES DE ANA E AIB

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
(A) Posição da estaca	0,039	1	0,039	15,883	0,0004*
(B) Auxina	0,009	1	0,009	70,560	0,000*
(C) Concentração	0,331	3	0,110	198,901	0,000*
Interação					
A X B	0,006	1	0,006	11,372	0,002*
A X C	0,046	3	0,015	27,813	0,000*
B X C	0,015	3	0,005	8,846	0,0002*
A X B X C	0,014	3	0,005	8,445	0,0003*
Erro	0,018	32	0,0006		

CV (%) = 23,09

ANEXO III – QUADROS DAS ANÁLISES DA VARIÂNCIA REFERENTES AO CAPÍTULO 3 – MICROPROPAGAÇÃO DE *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae)

(Dados transformados em log (y+1); ns=não significativo; (*)= significativo a 5% de probabilidade de erro)

1 – ASSEPSIA DAS BAINHAS FOLIARES

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
%cloro ativo	0,30	2	0,02	3,04	0,06ns
Tempo de exposição	0,00	1	0,00	0,05	0,83ns
Interação	0,01	2	0,00	0,60	0,55ns
Erro	0,26	50			

CV (%) = 22,11

2 – INDUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES EM EXPLANTES DE BAINHAS FOLIARES DE *Hippeastrum aulicum* MICROPROPAGADAS

2.1- FORMAÇÃO DE CALOS AOS 90 DIAS

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
ANA	0,001	2	0,001	0,259	0,774ns
BAP	0,252	2	0,126	64,847	0,000*
Interação	0,719	4	0,181	92,624	0,000*
Erro	0,052	27	0,002		

CV (%) = 28,18

2.2 - FORMAÇÃO DE CALOS AOS 120 DIAS

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
ANA	0,09	2	0,04	24,65	0,00*
BAP	0,43	2	0,22	125,33	0,00*
Interação	1,03	4	0,26	149,91	0,00*
Erro	0,05	27	0,002		

CV (%) = 2,39

2.3 - FORMAÇÃO DE CALOS AOS 150 DIAS

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
ANA	4,29	2	2,15	993,96	0,00*
BAP	1,94	2	0,97	449,21	0,00*
Interação	5,88	4	1,47	680,65	0,00*
Erro	0,6	27	0,002		

CV (%) = 3,00

2.4 - FORMAÇÃO DE CALOS AOS 210 DIAS

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
ANA	4,20	2	2,10	1007,71	0,00*
BAP	1,93	2	0,96	462,45	0,00*
Interação	6,28	4	1,57	753,38	0,00*
Erro	0,06	27	0,002		

CV (%) = 2,96

2.5 - FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES AOS 120 DIAS

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
ANA	0,09	2	0,05	8,80	0,00*
BAP	0,09	2	0,05	8,62	0,00*
Interação	0,15	4	0,04	7,15	0,00*
Erro	0,15	27	0,005		

CV (%) = 38,29

2.6 - FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES AOS 150 DIAS

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
ANA	0,02	2	0,01	12,81	0,001*
BAP	0,17	2	0,08	111,08	0,000*
Interação	0,08	4	0,02	28,02	0,000*
Erro	0,02	27	7,46E-004		

CV (%) = 8,49

2.7 - FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES AOS 210 DIAS

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
ANA	0,61	2	0,30	98,33	0,00*
BAP	0,64	2	0,32	104,30	0,00*
Interação	0,84	4	0,21	68,19	0,00*
Erro	0,08	27	0,003		

CV (%) = 9,47

2.8 - FORMAÇÃO DE BULBOS AOS 120 DIAS

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
ANA	0,04	2	0,019	56,11	000*
BAP	0,04	2	0,019	56,11	000*
Interação	0,16	4	0,039	117,35	000*
Erro	0,01	27	3,36E-004		

CV (%) = 4,5

2.9 - FORMAÇÃO DE BULBOS AOS 150 DIAS

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
ANA	0,04	2	0,018	22,74	000*
BAP	0,53	2	0,266	318,98	000*
Interação	0,07	4	0,017	20,032	000*
Erro	0,02	27	8,32E-004		

CV (%) = 17,40

3.0 - FORMAÇÃO DE BULBOS AOS 210 DIAS

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
ANA	1,23	2	0,61	454,36	000*
BAP	0,12	2	0,06	44,32	000*
Interação	1,58	4	0,39	292,32	000*
Erro	0,04	27			

CV (%) = 9,64

3.1 - FORMAÇÃO DE RAÍZES AOS 120 DIAS

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
ANA	0,08	2	0,04	14,15	0,0001*
BAP	0,54	2	0,27	100,71	0,0000*
Interação	0,95	4	0,24	88,44	0,0000*
Erro	0,07	27	0,003		

CV (%) = 3,04

3.2 - FORMAÇÃO DE RAÍZES AOS 150 DIAS

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
ANA	0,014	2	0,007	32,25	0,000*
BAP	0,35	2	0,18	797,81	0,000*
Interação	1,34	4	0,34	1518,57	0,000*
Erro	0,006	27	2,21E-004		

CV (%) = 6,55

3.3 - FORMAÇÃO DE RAÍZES AOS 210 DIAS

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
ANA	0,26	2	0,13	51,53	0,000*
BAP	0,11	2	0,05	21,58	0,000*
Interação	1,91	4	0,47	185,00	0,000*
Erro	0,07	27	0,003		

CV (%) = 8,96

2 – MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES EM MEIO MS COM 10, 15 E 30 μ M DE BAP

2.1 - NÚMERO DE BROTAÇÕES AOS 30 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Entre tratamentos	0,029	2	0,015	1,929	0,1672ns
Erro	0,182	24	0,008		

CV (%) = 14,50

2.2 – NÚMERO DE BROTAÇÕES AOS 60 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Entre tratamentos	0,001	2	0,0007	0,083	0,9204ns
Erro	0,205	24	0,0085		

CV (%) = 16,26

2.3 – NÚMERO DE BROTAÇÕES AOS 90 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Entre tratamentos	0,0064	2	0,003	1,371	0,273ns
Erro	0,0557	24	0,002		

CV (%) = 6,21

2.4 - NÚMERO DE BULBOS AOS 30 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Entre tratamentos	0,003	2	0,0014	0,255	0,777ns
Erro	0,131	24	0,0054		

CV (%) = 14,42

2.5 – NÚMERO DE BULBOS AOS 60 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Entre tratamentos	0,0018	2	0,0009	0,600	0,557ns
Erro	0,036	24	0,0015		

CV (%) = 20,20

2.6 – NÚMERO DE BULBOS AOS 90 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Entre tratamentos	0,0012	2	0,0006	0,117	0,89ns
Erro	0,12	24	0,0049		

CV (%) = 19,64

2.7 - NÚMERO DE RAÍZES AOS 60 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Entre tratamentos	0,052	2	0,0260	3,84	0,0358*
Erro	0,1636	24	0,0068		

CV (%) = 9,58

2.8 – NÚMERO DE RAÍZES AOS 90 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Entre tratamentos	0,161	2	0,080	19,00	0,000*
Erro	0,101	24	0,004		

CV (%) = 9,85

ANEXO IV – QUADROS DAS ANÁLISES DA VARIÂNCIA REFERENTES AO CAPÍTULO 4 – INDUÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS DE EMBRIÕES IMATUROS E EM SEGMENTOS DE PLÂNTULAS DE *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae), *In Vitro*

1 – PORCENTAGEM DE EMBRIOES IMATUROS DE *H. aulicum* QUE APRESENTARAM EMISSÃO DA RADÍCULA EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D E DO PERÍODO DE CULTURA EM MEIO DE CULTURA MS

(Dados transformados em log (y+1); ns=não significativo; (*)= significativo a 5% de probabilidade de erro)

1.1 – EMISSÃO DA RADÍCULA AOS 15 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Estadio embrionário	1,501	1	1,501	527,099	0,000*
Concentrações de 2,4-D	32,576	4	8,144	2859,853	0,000*
Interação	5,817	4	1,454	510,647	0,000*
Erro	0,142	50	0,003		

CV (%) = 6,9

1.2 – EMISSÃO DA RADÍCULA AOS 30 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Estadio embrionário	8,184	1	8,184	123,551	0,000*
Concentrações de 2,4-D	14,387	4	3,597	54,297	0,000*
Interação	7,843	4	1,961	29,599	0,000*
Erro	3,312	50	0,662		

CV (%) = 19,6

1.3 – EMISSÃO DA RADÍCULA AOS 60 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Estadio embrionário	10,547	1	10,547	134,564	0,000*
Concentrações de 2,4-D	9,111	3	3,037	38,742	0,000*
Interação	6,777	3	2,259	28,821	0,000*
Erro	3,135	40	0,078		

CV (%) = 23,3

1.4 – EMISSÃO DA RADÍCULA AOS 90 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Estadio embrionário	9,865	1	9,865	3595,820	0,000*
Concentrações de 2,4-D	12,170	3	4,057	1478,825	0,000*
Interação	8.696	3	2,899	1056,646	0,000*
Erro	0,111	40	0,003		
CV (%) = 3,9					

1.5 – EMISSÃO DA RADÍCULA AOS 120 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Estadio embrionário	9,126	1	9,126	2619,692	0,000*
Concentrações de 2,4-D	12,047	3	4,016	1152,697	0,000*
Interação	8,724	3	2,908	834,754	0,000*
Erro	0,139	40	0,003		
CV (%) = 4,3					

2- PORCENTAGEM DE EMBRIOES IMATUROS DE *H. aulicum* QUE PRODUZIRAM CALOS EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D E DO PERÍODO DE CULTURA EM MEIO DE CULTURA MS
(Dados transformados em log (y+1); ns=não significativo; *)= significativo a 5% de probabilidade de erro)

2.1 – PRODUÇÃO DE CALOS AOS 90 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Estadio embrionário	0,883	1	0,883	3,080	0,087ns
Concentrações de 2,4-D	13,965	3	5,404	16,237	0,000*
Interação	4,052	3	1,351	0,007	0,007*
Erro	11,467	40	0,287		
CV (%) = 30,82					

2.2– PRODUÇÃO DE CALOS AOS 120 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Estadio embrionário	0,074	1	0,074	0,257	0,621ns
Concentrações de 2,4-D	14,155	3	4,718	16,451	0,000*
Interação	7,477	3	2,492	8,690	0,000*
Erro	11,473	40	0,287		
CV (%) = 30,13					

3 – PORCENTAGEM DE CALOS COM RAÍZES E PORCENTAGEM DE CALOS COM PRODUÇÃO DE BULBOS

(Dados transformados em log (y+1); ns=não significativo; (*)= significativo a 5% de probabilidade de erro)

3.1 – PRODUÇÃO DE RAÍZES AOS 90 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Entre tratamentos	0,0456	1	0,0456	0,209	0,6623ns
Erro	2,187	10	0,219		

CV (%) = 34,74

3.2 – PRODUÇÃO DE RAÍZES AOS 120 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Entre tratamentos	0,0012	1	0,0012	0,216	0,6567ns
Erro	0,0555	10	0,0056		

CV (%) = 24,07

3.3 – PRODUÇÃO DE BULBOS AOS 120 DIAS DA INOCULAÇÃO

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Entre tratamentos	0,581	1	0,581	1,766	0,2134ns
Erro	3,289	10	0,329		

CV (%) = 42,23

4 – PORCENTAGEM DE EXPLANTES DE SEGMENTOS DE BULBO (METADE PROXIMAL) DE *H. aulicum*, QUE PRODUZIRAM CALOS APÓS 90 DIAS DE CULTURA EM MEIO DE CULTURA MS, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D

(Dados transformados em log (y+1); ns=não significativo; (*)= significativo a 5% de probabilidade de erro)

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste	Significância
Entre tratamentos	1,124	3	0,375	0,892	0,4625ns
Erro	8,406	20	0,420		

CV (%) = 23,49